

UNIVERSITE DE GENEVE

Laboratoire de Microbiologie générale

Laboratoire de Biophysique

FACULTE DES SCIENCES

Professeur G. Turian

Professeur W. Arber

L'ACTION DU SITE GENETIQUE H DES BACTERIOPHAGES P22 ET L
SUR LA PHYSIOLOGIE DE LEUR HOTE SALMONELLA TYPHIMURIUM

T H E S E

présentée à la Faculté des sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur en microbiologie

par

Renée FAVRE

de

Cormoret (Berne)

Thèse No. 1511

Naples, Italie

Laboratoire international de génétique et biophysique

1970

UNIVERSITE DE GENEVE

Laboratoire de Microbiologie générale

Laboratoire de Biophysique

FACULTE DES SCIENCES

Professeur G. Turian

Professeur W. Arber

L'ACTION DU SITE GENETIQUE H DES BACTERIOPHAGES P22 ET L
SUR LA PHYSIOLOGIE DE LEUR HOTE SALMONELLA TYPHIMURIUM

T H E S E

présentée à la Faculté des sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur en microbiologie

par

Renée FAVRE

de

Cormoret (Berne)

Thèse No. 1511

Naples, Italie

Laboratoire international de génétique et biophysique

1970

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur G. Turian, directeur de thèse, et d'une commission composée des professeurs W. Arber et P. Amati de l'Université de Naples, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève le 16 mars 1970

Thèse No. 1511.



...the ...
...the ...
...the ...
...the ...

...the ...
...the ...



Je remercie vivement les professeurs G. Turian, W. Arber et P. Amati sans lesquels je n'aurais pas pu faire ce travail. En effet, le professeur Turian a accepté immédiatement de diriger cette thèse, le professeur Arber n'a cessé de m'aider par de nombreuses discussions et par ses critiques toujours judicieuses et le professeur Amati m'a donnée l'idée de départ ainsi que sa collaboration intellectuelle et pratique tout le long des expériences que j'ai faites dans son laboratoire à Naples.

Toute ma gratitude va aussi au personnel du Laboratoire international de génétique et biophysique de Naples, et particulièrement au Dr. M. Di Girolamo pour son aide dans l'expérience in vitro de la synthèse des protéines et à Mme. S. Hafkin pour son inlassable patience lors de la mise en page du manuscrit.

Je tiens aussi à remercier Mme. G. Gujer pour son intérêt et ses suggestions et le Dr. J. Séchaud pour avoir relu le manuscrit.

Les phages tempérés P22 et L lysogénisent facilement *Salmonella typhimurium* par intégration stable de leur chromosome à celui de la bactérie. Par définition, des bactéries lysogènes sont capables de produire des phages dans certaines conditions, lorsque le contrôle de répression produit par le prophage est dérangé. Le prophage conditionne l'immunité de la cellule lysogène à une nouvelle infection par le même phage. Cette immunité est produite par un répresseur, produit diffusible qui agit au niveau d'un ou de plusieurs opérateurs du chromosome phagique. La stabilité du prophage et l'immunité sont donc soumises à un même type de régulation. Lorsque des phages tempérés infectent des bactéries, ils peuvent soit lysogéniser leur hôte, soit se reproduire et provoquer la mort des bactéries et leur lyse. La probabilité de lysogénisation ou du cycle lytique dépend du phage infectant, de l'hôte et des conditions extérieures de culture. Sur des boîtes d'agar contenant des bactéries en quantité adéquate, les phages tempérés produisent des plages troubles parceque les bactéries lysogénisées poussent dans le centre de la plage, alors qu'un phage virulent, donc incapable de lysogéniser, produit des plages claires. Un grand nombre de mutants "clairs" de P22 ont été isolés (Levine, 1957; Levine et Curtiss, 1961). Il s'agit de mutants qui ont perdu une des fonctions nécessaires à la lysogénisation. Ces mutants sont répartis en trois groupes de complémentation: C_1 , C_2 et C_3 . C_1 et C_2 lysent les bactéries avec libération de phages. C_3 peut encore lysogéniser les bactéries dans une faible proportion.

Les phages P22 et L sont deux phages tempérés apparentés, du groupe A de Boyd (Boyd et Bidwell, 1957), de morphologie identique, présentant des homologies génétiques et sérologiques (Bezdek et Amati, 1967).

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545925_0026

Ils sont hétéro-immuns et de densité différente en ClCs. Les deux phages diffèrent aussi dans leur développement suivant la souche de bactéries infectée. Dans la souche LT2, ils se reproduisent normalement. Dans la souche 1559, L seul croît, tandis que P22 provoque la mort des bactéries infectées, sans production de phages. Une première analyse génétique a montré qu'un caractère génétique (^LH) du phage L était responsable de sa croissance sur 1559. Ce caractère peut être transféré à P22 par recombinaison, et le recombinant P22 porteur de ^LH croît normalement dans 1559. Il était donc important de caractériser ce caractère H et d'étudier l'action du produit de ce gène dans la restriction de P22 par 1559. Cette étude est le sujet de ce travail. Elle a été faite par l'étude physiologique et génétique de recombinants entre P22 et L pour le caractère H et par l'analyse des taux de synthèse du DNA, du RNA et des protéines après l'infection des s.t.m. LT2 et 1559 par P22 et L et leurs recombinants. La comparaison des taux de synthèse obtenus dans une lysogénisation normale (ou dans le cycle végétatif) avec ceux obtenus lors de l'infection abortive ont permis de caractériser les événements qui produisent la mort des s.t.m. 1559 infectées par P22.

Une partie des résultats présentés ici a déjà été publiée ailleurs (Favre, Bezdek et Amati, 1968).

ABBREVIATIONS

- H : site génétique phagique responsable de l'infection abortive ou normale de 1559 par P22 ou L.
- P_H : site génétique H du phage P22.
- L_H : site génétique du phage L.
- Produit H : produit du site H.
- s.t.m. : Salmonella typhimurium.
- P_i : caractère génétique responsable de l'immunité contre P22.
- L_i : caractère génétique responsable de l'immunité contre L.
- CAP : chloramphenicol.
- TCA : acide trichloro-acétique.
- w.t. : type sauvage (wild type).
- ts : température sensible.

MATERIELS ET METHODES

Souches: Le phage L a été isolé par Bezdek et Amati d'une souche de LT2 type sauvage provenant du laboratoire du Dr. B. Magasanik.

Le phage P22 type sauvage (w.t.) provient du laboratoire du Dr. B. Magasanik.

Les mutants suivants de P22 proviennent du laboratoire du Dr. M. Levine:

- P22 C₁ : mutant clair de P22. La fonction du gène C₁ est nécessaire à l'établissement de la lysogénisation, mais non à son maintien.
- P22 C₂ : mutant clair de P22. La fonction du gène C₂ est nécessaire au maintien de la lysogénisation. En infection mixte de P22 C₁ et P22 C₂ on obtient des bactéries lysogènes pour P22 C₁, jamais pour P22 C₂.
- P22 ts B23 : Ce mutant est température-sensible, c'est-à-dire qu'il est incapable de se développer à 42° alors qu'il croît normalement à 30°.
- P22 18 (P22 ts B62, B63, sie⁻): Ce mutant porte deux mutations température-sensibles. Sa mutation sie⁻ signifie qu'il ne produit pas d'exclusion de phage surinfectant. En effet, une souche LT2 lysogène pour P22 exclut tout autre phage surinfectant (aussi bien que P22); le phage s'adsorbe bien sur la bactérie lysogène mais ensuite il est inhibé (Walsh et Meynell, 1967; Rao, 1968).
- P22 m₃ : Ce mutant présente une morphologie spéciale des plages sur milieu indicateur V où elles sont entourées d'un halo brun.

Les mutants P22 ts21 et L ts51 ont été isolés par Bezdek et Kraiselburd.

Salmonella typhimurium:

- LT2 : Cette souche est un revertant adénine^r isolé à partir d'une souche LT2 ad-13 décrite par Yura (1956) et donnée par le Dr. M. Levine. Il n'était pas possible d'utiliser LT2 ad-13 pour les expériences d'incorporation de C¹⁴ Thymidine parce que la

présence d'adénine dans le milieu provoque une incorporation irrégulière de la thymidine. Cette souche est sensible à P22 et L.

1559 : Cette souche est prototrophe; elle provient de la collection du Dr. J. Monod et a été donnée par le Dr. B. Magasanik. Elle est sensible à L mais restreint partiellement P22.

LT2 proA 107 } Ces souches auxotrophes pour la proline proviennent du
LT2 proB 45 } laboratoire du Dr. Sanderson.
LT2 proC 110 }

Milieux:

Bouillon H : Le bouillon H a été utilisé pour les cultures liquides.

H ₂ O dist.	1000 cc.
NaCl	5 gr.
Glucose	1 gr.
Bacto peptone	5 gr.
Bacto nutrient broth	8 gr.
Le pH est de	7

Milieu solide pour l'étalement:

Milieu EHA: Le milieu a été utilisé pour les étalements sur agar.

a) Couche inférieure (30 à 40 ml par boîte de Pétri):

H ₂ O dist.	1000 cc.
NaCl	8 gr.
Glucose	1,3 gr.
Na. citrate	2 gr.
Bacto tryptone Difco	13 gr.
Bacto agar Difco	10 gr.
Le pH a été ajusté à	7

b) Couche supérieure (2,5 ml par boîte):

H ₂ O dist.	1000 cc.
NaCl	8 gr.
Glucose	3 gr.
Na. citrate	2 gr.
Bacto tryptone	13 gr.
Bacto agar	6,5 gr.

Milieu indicateur V:

Le milieu solide permet de reconnaître les P22 m₃ dont les plages sont entourées d'un halo brun (Levine, 1957).

a) Couche inférieure:

Bacto tryptone Difco	1%
Extrait de levure Difco	0,5%
NaCl	0,05%
Ajuster le pH à	7
Agar Difco	1%
Glucose	0,85%
Alizarine jaune GG.	0,08%
Aniline bleue	0,007%

Le glucose et les colorants sont stérilisés et ajoutés séparément.
Couler 30 ml du mélange final par boîte de Pétri.

b) Couche supérieure:

Bacto nutrient broth Difco	0,8%
NaCl	0,5%
Agar Difco	0,65%

Milieu minimum LT (variante du milieu minimum décrit par Sanderson et Demerec, 1964)

K_2HPO_4	10,5 gr.
KH_2PO_4	4,5 gr.
$(NH_4)_2SO_4$	1 gr.
Citrate de Sodium	0,47 gr.
H_2O dist.	500 ml.

Stériliser et conserver ce mélange de sels. Au moment de l'utilisation, ajouter 4 gr. de glucose et 0,05 gr. de $MgSO_4$ (en solutions concentrées stériles). Chauffer le mélange final à 45° et l'ajouter à 500 ml d'eau distillée contenant 12 gr. d'agar Difco, stérilisés au préalable et refondus. Couler 30 ml par boîte de Pétri.

Couche supérieure: Ajouter seulement 7 gr/litre d'agar pour l'agar mou.

Milieu M9A (avec acides aminés):

* Mélange de sels	100 ml.
Glucose 4%	100 ml.
$MgSO_4$ 0,1M	10 ml.
Amino acides Difco 15% filtrés sur du charbon actif	100 ml.
H_2O	690 ml.

* Mélange de sels:

70 gr. $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
30 gr. KH_2PO_4
5 gr. NaCl
10 gr. NH_4Cl

dans 1 litre

Pour les expériences d'incorporation de C^{14} Thymidine ou de C^{14} Uracil, le M9A a été utilisé. Pour l'incorporation de C^{14} Leucine, on a ajouté 10 $\mu\text{g/ml}$ de leucine et 20 $\mu\text{g/ml}$ des 19 autres acides aminés à la place des acides aminés Difco; dans de telles conditions, le temps de génération des bactéries est allongé de 1,3 fois. Les substances radioactives suivantes provenaient de la New England Nuclear Company:

C^{14} Thymidine,	activité spécifique	30 $\mu\text{c}/\mu\text{mole}$
C^{14} Uracil,	"	"
C^{14} Leucine	"	250 $\mu\text{c}/\mu\text{mole}$

Tampon N

Tris	0,01 M - pH 7,8
Acétate de Mg	0,01 M
KCl	0,06 M
Mercaptoethanol	0,006 M

Le L chloramphenicol (CAP) était un don apprécié de Lepetit Pharmaceutical S.p.A., Milan, Italie.

Méthodes

Comptage des phages actifs

La méthode de la couche d'agar (Adams, 1959) a été utilisée; avant l'étalement 0,1 ml de bactéries indicatrices (poussées une nuit à 37° en bouillon H avec aération) à $10^6/\text{ml}$ étaient mélangées à 0,1 ml de la suspension de phages, puis laissées 5 minutes à 37° , afin de permettre une bonne adsorption des phages (90 à 99%). Ensuite 2,5 ml d'agar fondu était ajouté et le tout étalé sur une boîte d'agar solide.

Stock de phages

Les bactéries en croissance exponentielle à 10^8 sont infectées avec une multiplicité d'infection de 10^{-4} . Après 8 h. à 37° avec aération, on ajoute du CHCl_3 , puis on centrifuge les débris bactériens et filtre le lysat sur millipore. La concentration de phages variait entre $5 \cdot 10^9$ et $5 \cdot 10^{10}$.

Expériences de marquage avec des radioisotopes

Dans les expériences d'incorporation de matériel radioactif les cellules en croissance exponentielle entre 5 et $8 \cdot 10^7$ bactéries/ml en M9 sont infectées par des phages avec une multiplicité d'infection de 20. Des aliquots de 1 ml sont prélevés à différents temps après l'infection et ajoutés à 0,2 ml de radioisotopes dilués en milieu nutritif (correspondant à 0,2 μc) dans des tubes préchauffés. Après une minute d'incubation, on ajoute 1 ml d'acide trichloroacétique glacé à 10% contenant 2% de casamino-acides ou de thymidine et uracile froids. Après une demi-heure au minimum dans la glace fondante, les précipités sont récoltés par filtration sur des filtres millipores, lavés deux fois avec 5 ml d'acide trichloroacétique 5% et comptés dans un compteur SELO à gaz.

Dans les expériences d'incorporation de C^{14} thymidine en présence de chloramphenicol, la méthode est la même: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de l'antibiotique sont ajoutés 15 secondes avant l'infection ou aux temps indiqués.

Génétique du phage

a) Croisements: Les bactéries en croissance exponentielle sont lavées, reprises en tampon et carencées 45' à 37° avec aération. La concentration est ajustée à 10^8 cell./ml. Les bactéries sont alors infectées puis laissées 5' à 37° (95% d'adsorption). Du sérum anti-P22 est alors ajouté (K final 2). Après 10', une dilution de 10^{-3} est faite, puis les bactéries infectées sont laissées 90' à 37° . On ajoute alors du chloroforme et titre les phages produits.

b) Complémentation: La méthode d'étalement en lignes a été utilisée pour isoler les recombinants C_1 C_2 . Sur une boîte d'agar 0,2 ml d'indicateur sont ajoutés à la couche supérieure d'agar mou. Quand celle-ci est solidifiée, des mutants C_1 et C_2 (suspension à 10^{-9}) sont étalés en lignes à la surface de la boîte. Quand ces lignes sont sèches, on fait des bandes perpendiculaires des recombinants à analyser. Les mutants C_1 complémentent avec les mutants C_2 et vice-versa permettant une lysogénisation des bactéries indicatrices. Celles-ci croissent alors à l'intersection des bandes de phages. Les recombinants C_1 C_2 ne complémentent avec aucun des mutants C_1 ou C_2 .

Synthèse in vitro des protéines

Des extraits ont été préparés à partir de 500 ml de culture de 1559 ou LT2 en M9 à 2.10^8 cell./ml infectées avec une m.o.i. = 10. Après infection, les cellules ont été laissées 20 minutes à 37° avec aération, puis ont été refroidies brusquement par adjonction de glace pilée. Elles ont été ensuite centrifugées, resuspendues et lavées deux fois en tampon N. Finalement, elles ont été resuspendues dans 2 ml de tampon N et soumises 3 minutes aux ultra sons. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (120 minutes à 20.000 g) et 3 µg/ml de DNase ont été ajoutés au surnageant et incubés 10 minutes à 30°. Deux autres centrifugations (20 minutes à 20.000 g et 30 minutes à 30.000 g) ont été faites pour enlever les débris cellulaires restants, et les extraits ont été ensuite dialysés 4 heures dans du tampon N.

L'essai in vitro a été fait dans le mélange de réaction suivant (en µmole/ml): 100 de Tris pH 7,8; 9 d'acétate de magnésium; 50 d'acétate d'ammonium; 6 de mercaptoéthanol; 1 ATP; 5 de sel de phosphoénolpyruvate de K; 20 µg de phosphoénolpyruvate kinase sous forme cristalline; 0,05 de chacun des 20 aminoacides, sauf la phenylalanine; 0,03 de GTP, CTP et UTP;

3 μC de C^{14} phenylalanine (222 $\mu\text{C}/\text{mole}$); dans le mélange furent ajoutés 20 μg de poly U ou 200 μg de MS2-RNA et des différents extraits (variante du mélange de réaction utilisé par Matthaei et Nirenberg, 1961).

Des échantillons de 0,25 ml ont été incubés 30 minutes à 35° puis précipités par de l'acide trichloracétique à 5%. Les précipités ont été lavés 2 fois, resuspendus en TCA 5%, puis bouillis 15 minutes et filtrés sur Millipore. La radioactivité a été comptée dans le compteur Selo.

La quantité de protéines des extraits a été déterminée selon la technique décrite par Lowry et al. (1951).

Curing

La culture de 1559 (P22) en M9 à une concentration de $2 \cdot 10^8$ a été soumise aux UV pendant 60 secondes (10 ml dans une boîte de pétri à 50 cm de distance d'une lampe UV Siemens, 7,7 a.). Ensuite des échantillons de 0,1 ml ont été étalés avec un rateau sur des boîtes d'agar EHA. Après 24 heures, les bactéries survivantes ont été répliquées sur des boîtes d'agar et sur des boîtes d'agar contenant du P22 C_1 C_2 (10^9 phages par boîte). Les colonies qui paraissaient présenter le plus de zones de lyse sur les boîtes avec phages étaient isolées à partir de la boîte sans phage. Elles étaient testées ensuite pour leur capacité de restreindre P22 par mesure de l'efficacité d'étalement du phage sur chacune d'elles.

Mutagenisation

La souche 1559 en M9 à 2×10^8 a été laissée 15 minutes à 37° avec aération en présence de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de nitrosoguanidine (1% de survivant). Elle a ensuite été lavée deux fois, puis remise pendant une heure à 37°. Elle a ensuite été étalée puis répliquée sur P22 C_1 C_2 . La mesure de la capacité de restreindre P22 de chaque souche douteuse était ensuite faite de la même manière que pour le curing.

Production de double-lysogènes

Les bactéries lysogènes pour P22 ou L en culture exponentielle à 2.10^8 étaient infectées par P22, L ou leurs recombinaisons à une multiplicité d'infection de 10 ou moins. Après 10 minutes du sérum anti-P22 était ajouté, et le tout laissé à 37° 10 minutes. Puis la culture infectée était diluée à 10^{-4} , et les centres infectieux et survivants étaient comptés (par étalement).

Avant d'ajouter le sérum, un échantillon était prélevé et chloroformé pour tuer les bactéries infectées. Il était ensuite dilué et étalé pour compter les phages libres et mesurer ainsi l'adsorption du phage infectant.

Deux cents bactéries survivantes étaient ensuite repiquées en petites bandes, puis répliquées sur les indicateurs LT2, LT2(L), 1559 et LT2(P22 18). Les double-lysogènes lysent les quatre indicateurs, P22 lysant LT2(L) et L lysant 1559 et LT2 (P22 18). Une souche lysogène pour L seule ne lyse pas LT2(L); une souche lysogène pour P22 ne lyse pas 1559 et LT2 (P22 18).

Co-transduction des caractères responsables de la restriction et de pro

Un stock du phage L était obtenu par induction aux UV de la souche 1559 (L). Une culture de bactéries réceptrices en bouillon H était laissée une nuit à 37° avec aération puis mélangée avec le phage transducteur (multiplicité d'infection 1 ou 0,1).

Après 20' d'adsorption à 37°, le mélange était étalé sur des boîtes de milieu minimum LT (0,1 ml par boîte). La souche réceptrice et le phage étaient aussi étalés pour tester la réversion ou d'éventuelles contaminations. Après 48 heures à 37°, les transductants pro^+ avaient poussés sur milieu LT. Une colonie isolée de chaque transductant était repiquée en petite bande de 0,5 cm. pour permettre des réplifications. Après 6-7 heures à 37° ou une nuit à 25°, les transductants étaient resuspendus dans 0,25 ml de bouillon H, puis laissés 3 heures à 37°, avant d'y ajouter une quantité titrée de P22

(200 phages par boîte); après 10 minutes d'adsorption chaque mélange était étalé sur agar, et laissé une nuit à 37°. Les plages produites par P22 étaient alors comptées. Cette mesure d'efficacité d'étalement de P22 par les transductants devait permettre d'isoler les éventuels co-transductants qui auraient reçu les caractères génétiques de 1559 responsables de la restriction de P22.

Les transductants purifiés et isolés étaient aussi testés pour la présence du prophage, par répllication sur des boîtes avec indicateur.

RESULTATS

Caractérisation génétique de la fonction H impliquée dans la restriction de P22 par l'hôte 1559.

Par des croisements entre P22 et L sur la souche LT2, Bezdek a trouvé trois classes de phages présentant l'immunité de P22 (i) et différentes efficacités d'étalement sur la souche 1559 (Favre et al., 1968). Les propriétés de ces classes sont résumées dans le Tableau 1.

TABLEAU 1

Efficacité d'étalement des phages porteurs de l'allèle d'immunité de P22 et provenant d'un croisement entre P22 et L sur les souches de Salmonella typhimurium

:	:	Souche indicatrice			:	:				
:	Phage	:	LT2	:	1559	:	1559 (L)	:	Genotype H	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	présumé	:

Phages
parentaux:

P22	1	10^{-3}	10^{-2} à 10^{-1}	P_{H1}	P_{H2}
L	1	1	0	L_{H1}	L_{H2}

Phages pro-
duits par
LT2 en in-
fection mixte
et ayant
l'immunité
de P22:

I	1	10^{-3}	10^{-2} à 10^{-1}	P_{H1}	$P_{H2} = P22$
II	1	1	1	L_{H1}	L_{H2}
III	1	10^{-3}	1	L_{H1}	P_{H2}

Deux sites génétiques semblent donc contrôler l'e.o.p. de P22 sur 1559, appelés H1 et H2. La position de ces deux sites génétiques sur la carte se trouve entre m_3 et C_2 (voir Fig. 1). Les génotypes des classes décrites dans le Tableau 1 sont $P_{H1} P_{H2}$ (classe I), $L_{H1} L_{H2}$ (classe II) et $L_{H1} P_{H2}$ (classe III).



Fig. 1

Localisation approximative des markers H sur le génome de P22. Valeurs en centimorgans (Bezdek et Amati, 1968).

La classe restante $P_i P_{H1} L_{H2}$ n'avait pas encore été découverte. Ce type a été recherché dans un croisement entre $P22 m_3^+ ts21 C_2^+$ et $L ts51 m_3^- C_2^-$ par l'analyse de 800 recombinants $m_3^+ C_2^+$ ayant perdu la thermosensibilité (Fig. 2).



Fig. 2

Schéma du double recombinant représentant la classe $P_i P_{H1} L_{H2}$.
double recombinant $P_i m_3^+ P_{H1} L_{H2} C_2^+$: - - - -.

D'après la Figure 2, on voit que la plupart des double-recombinants $m_3^+ C^+$ poussant à 42° devraient porter le marqueur P_{H1} et L_{H2} . Lorsque l'expérience a été faite, le marqueur ts21 n'avait pas encore été localisé avec précision entre les marqueurs H1 et m_3 , ce qui impliquait l'analyse d'un grand nombre de recombinants. Pourtant, la mesure de l'efficacité d'étalement sur 1559, 1559(L) et LT2 des 800 recombinants $m_3^+ C_2^+$ n'a pas permis de déceler une quatrième classe de recombinants. Il faut donc en déduire que si cette combinaison n'est pas létale, elle donne des phages qui se comportent de la même manière que ceux d'une des autres classes.

Il est intéressant de noter que lorsque l'indicateur 1559 est lysogène pour L, l'efficacité d'étalement de P22 augmente considérablement. De plus, les mutants clairs de P22 donnent des plages troubles sur 1559(L). Bezdek et Amati (1967) interprétèrent cet "effet d'aide" comme une induction du prophage L par le phage surinfectant. Les plages troubles sont le résultat d'une complémentation de P22 par L et les bactéries de la souche 1559(L) qui produisent du phage P22 produisent aussi L. Une étude de l'infection de 1559(L) par P22 et de la production de double-lysogènes ou de phages est présentée plus loin (Tableau 3).

Complémentation entre P22 et L.

Lorsque 1559 est infectée par P22 et L, il se produit une complémentation de P22 par L et les bactéries produisent des phages des deux types. Il était intéressant de voir si cette complémentation était limitée, soit parceque le produit H de L était fabriqué en petite quantité, soit parceque le produit H de P22 était compétitif avec celui de L. La production de P22 et L par 1559 en infection mixte avec des multiplicités d'infection variables de P22 et L pouvait résoudre cette question. En

effet dans les deux cas le rendement total aurait du être inversement proportionnel à la multiplicité d'infection de P22. Les résultats exposés dans le Tableau 2 montrent que le rendement total varie peu et que le rendement respectif de chaque type de phage est directement proportionnel à la m.o.i. de chacun. Les produits des gènes L_H sont donc fabriqués en quantité suffisante pour compléter 10 phages P22 pour 1 phage L et sont dominants par rapport aux produits des gènes P_H , puisque ceux-ci ne sont pas compétitifs avec ceux des gènes L_H .

TABLEAU 2

Complémentation de P22 par L en infection mixte de 1559 en fonction de la multiplicité d'infection de chaque phage

Multiplicité :		Production de :		% de phages :		% de P22 infectants :	
d'infection :		phages :		produit :		par rapport à :	
L C ₁ :	P22 C ₁ :	L C ₁ :	P22 C ₁ :	L C ₁ :	P22 C ₁ :	L C ₁ :	P22 C ₁ :
13	1,3	7,5.10 ¹⁰	9.10 ⁹	90	10	9	
9,9	3,3	2,8.10 ¹⁰	2,3.10 ¹⁰	56	44	25	
3,3	9,9	2.10 ¹⁰	4,8.10 ¹⁰	30	70	75	
1,3	13	8.10 ⁹	5,3.10 ¹⁰	13	87	91	

Une culture exponentielle de 1559 à $1,5.10^8$ bact/ml a été répartie dans quatre tubes contenant déjà les phages L C₁. Le phage P22 C₂ a été ajouté tout de suite après (les phages n'avaient pas été mélangés tout de suite pour éviter l'exclusion de L due à P22).

Après 60' à 37°, la lyse des bactéries a été complétée avec du chloroforme et les phages titrés sur LT2, 1559 et LT2 (L).

L'adsorption à 15' après l'infection variait entre 90 et 95%.

Taux de synthèse des cellules infectées

Les taux des synthèses du DNA, du RNA et des protéines de LT2 et 1559 infectées par P22, L et leurs recombinants ont été étudiés pour mieux caractériser l'effet des produits H dans la lysogénisation, le cycle végétatif ou la restriction.

Taux de synthèse du DNA

Smith et Levine (1964, 1965) ont décrit la cinétique de la synthèse du DNA dans s.t.m. LT2 infectée par P22 et ses mutants clairs. Après l'infection de LT2 par P22, on observe une première inhibition de la synthèse globale du DNA; après trois ou quatre minutes, le DNA du phage commence sa replication. Dans le cycle lysogène, le DNA phagique est réprimé à 6 - 8 minutes par le produit du gène C_1 . Après 15 minutes le DNA cellulaire reprend sa replication et rejoint une courbe parallèle à celle des cellules non-infectées. Le décalage entre les courbes parallèles exprime un retard des cellules infectées par rapport aux cellules non-infectées, et non la proportion des cellules lysogénisées qui est élevée (environ 90%). Avec un mutant C_1 , la synthèse du DNA phagique n'est pas inhibée à la 8^e minute et continue pour atteindre son maximum vers la 30^e minute. Au contraire, un mutant C_2 présente l'inhibition due à C_1^+ à la 8^e minute, et le DNA du phage reprend sa synthèse à la 15^e minute pour atteindre son maximum après une heure. Les bactéries infectées par un mutant C_1 lysent après environ 40 minutes, celles infectées par C_2 plus tard (après environ 80 minutes). La répression contrôlée par C_1^+ est donc de courte durée, alors que celle de C_2^+ est indispensable au maintien de l'état lysogène.

Si des bactéries LT2 et 1559 sont infectées avec le phage L, on obtient des résultats similaires à ceux obtenus avec P22 sur LT2 (Fig. 3). Mais on observe une forte inhibition du taux de synthèse du DNA lorsque l'on infecte 1559 avec P22. Cette inhibition se produit après la 8^e minute puisque l'on observe encore le premier pic de synthèse de DNA phagique. Pour déterminer le moment exact de cette inhibition, la souche 1559 a été infectée avec des mutants C₁, C₂ et C₁ C₂ de P22 pour éliminer les répressions naturelles du phage.

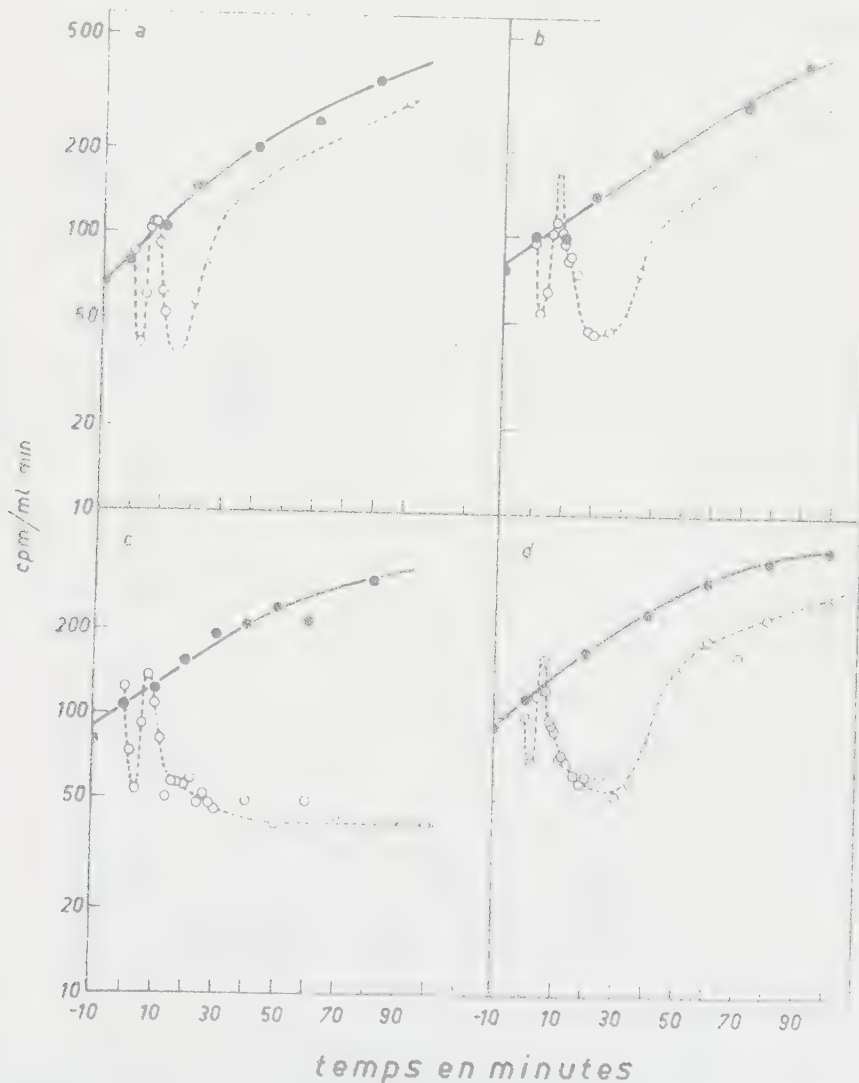


Fig. 3

Taux d'incorporation de la C¹⁴ Thymidine dans les cellules infectées par des phages; (a) et (b): souche LT2 infectée par les phages P22 (a) et L (b); (c) et (d): souche 1559 infectées par les phages P22 (c) et L (d). ●—●: bactéries non-infectées. ○.....○: bactéries infectées. Cpm/ml min. signifie le compte par minute de désintégrations pour un ml de culture mis en présence de substance radioactive pendant une minute.

Sur la Figure 4 on peut voir que les phages P22 C₁ peuvent continuer la synthèse du DNA jusqu'à la 12^e minute après l'infection, où l'on observe une très forte inhibition de la synthèse du DNA.

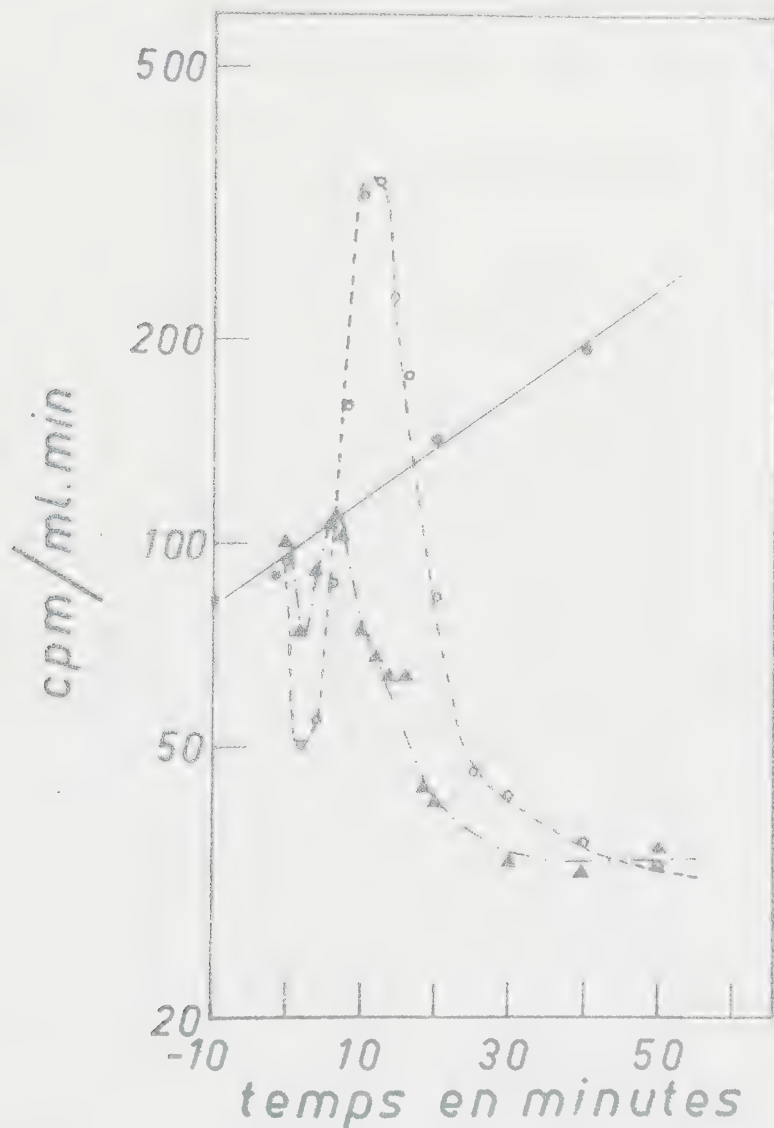


Fig. 4

Taux d'incorporation de la C¹⁴ Thymidine dans la souche 1559 infectée par P22 C₁⁵ (○.....○) et P22 C₂⁷ (▲.....▲). Contrôle non-infecté

●.....●.

Le mutant P22 C_2 présente la même courbe que P22 w.t., avec l'inhibition de C_1^+ à la 8^e minute, alors que le mutant P22 $C_1 C_2$ (Fig. 6) se comporte comme le mutant C_1 , ce qui démontre que l'inhibition du DNA à la 12^e minute est indépendante de celle provoquée par le répresseur C_2 . Lorsque des recombinants de P22 ont reçu les deux marqueurs L_{H1} et L_{H2} , ils ne sont plus restreints sur la souche 1559 et l'inhibition de la synthèse du DNA est passagère (Fig. 5).

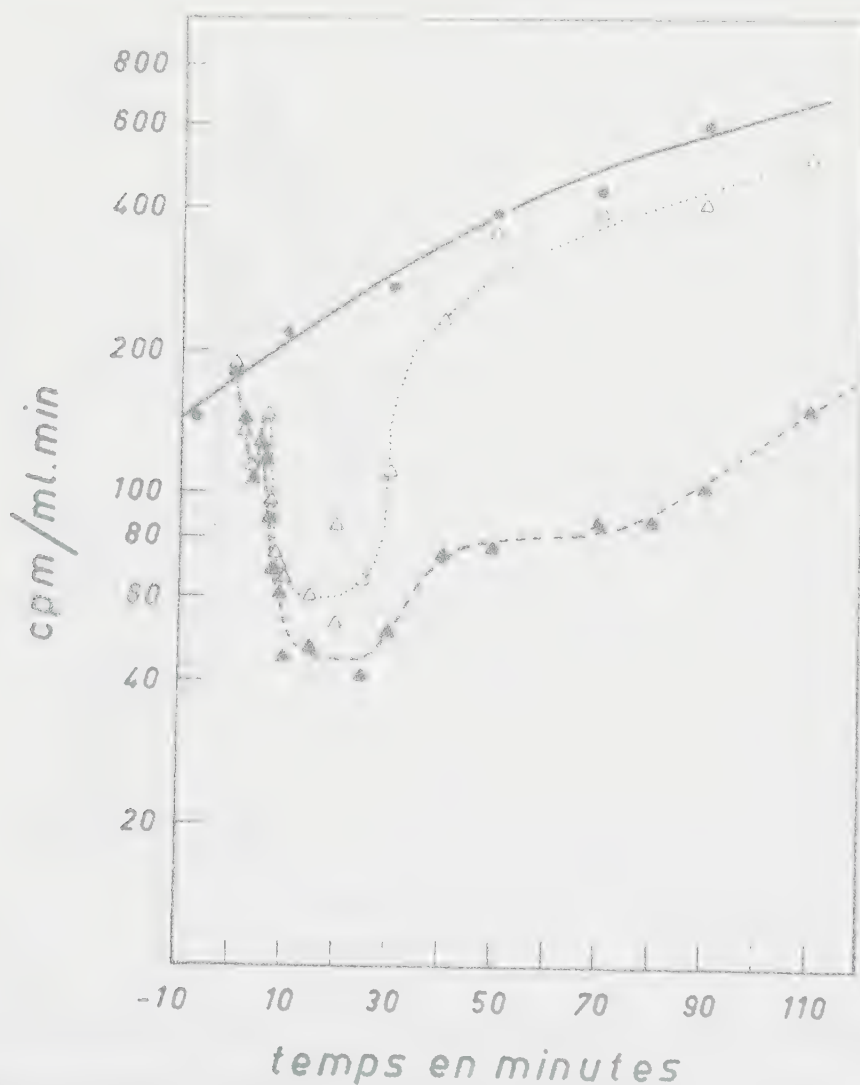


Fig. 5

Taux d'incorporation de la C^{14} Thymidine dans la souche 1559 infectée par P22 L_{H1}, P_{H2} (▲.....▲) et P22 L_{H1}, L_{H2} (Δ.....Δ). Contrôle non-infecté (●—●).

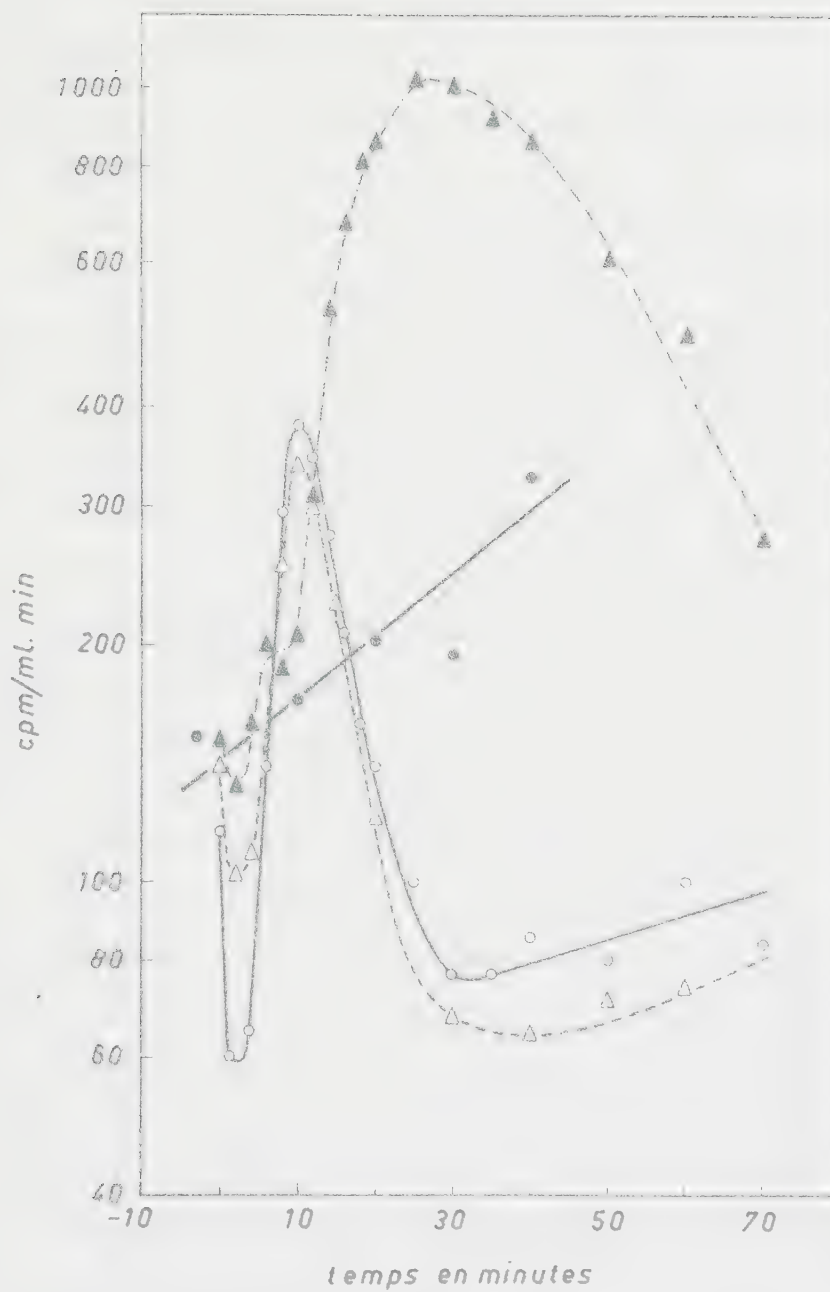


Fig. 6

Taux d'incorporation de la C^{14} Thymidine dans la souche 1559 infectée par P22 $\text{C}_1 \text{ C}_2$ (○—○), P22 $^{\text{L}}\text{H1 C}_1$ (△—△) et P22 $^{\text{L}}\text{H1 } ^{\text{L}}\text{H2 C}_1 \text{ C}_2$ (▲—▲). Contrôle non-infecté (○—○).

La figure montre aussi le taux de synthèse du DNA de la souche 1559 infectée par P22 ^LH1. Dans ce cas, il semble qu'il y ait une faible désinhibition de la synthèse du DNA, bien que le mutant présente la même efficacité d'étalement que P22 (cf. Table 1).

Sur la figure 6, on voit aussi le taux d'incorporation de C¹⁴ Thymidine dans des cellules infectées par P22 ^LH1 C₁, qui se comporte exactement comme P22 ^PH1 C₁. Ceci exclut aussi l'hypothèse d'une interaction entre les contrôles H1 et C₂. Sur cette même figure on voit la courbe d'incorporation de P22 ^LH1 ^LH2 C₁ C₂ qui n'est plus restreint et qui se comporte comme P22 C₁ sur LT2.

On a vu que si la souche 1559 lysogène pour L est utilisée comme indicateur, l'efficacité d'étalement de P22 est considérablement augmentée par rapport à celle obtenue sur 1559. Cet "effet d'aide" peut être détecté si l'on suit la cinétique du taux de synthèse du DNA après infection de 1559(L) par P22 (Fig. 7). Lorsque 1559(L) est infectée par P22 w.t., la courbe de la synthèse du DNA a un aspect semblable à celui de la courbe obtenue dans LT2 infectée par le même phage, mais avec un niveau beaucoup plus bas du taux de synthèse. Sur la même figure (7) on observe les courbes obtenues avec P22 ^LH1 ^PH2 et P22 ^LH1 ^LH2. Si P22 porte l'allèle ^LH1 on observe un premier pic de synthèse du DNA plus large et plus tardif que celui du DNA du P22 w.t. Le taux final de synthèse est aussi plus élevé que celui de P22 w.t.

Lorsque P22 porte les deux marqueurs ^LH il se comporte à peu près comme L dans 1559, puisque le phage n'est plus restreint ou réprimé par les barrières immunitaires. Dans les trois sortes d'infections, le pourcentage de bactéries survivantes était semblable (environ 40%, ou dans certains cas, même plus grand pour des cellules infectées par P22 que par P22 ^LH1 ^LH2).

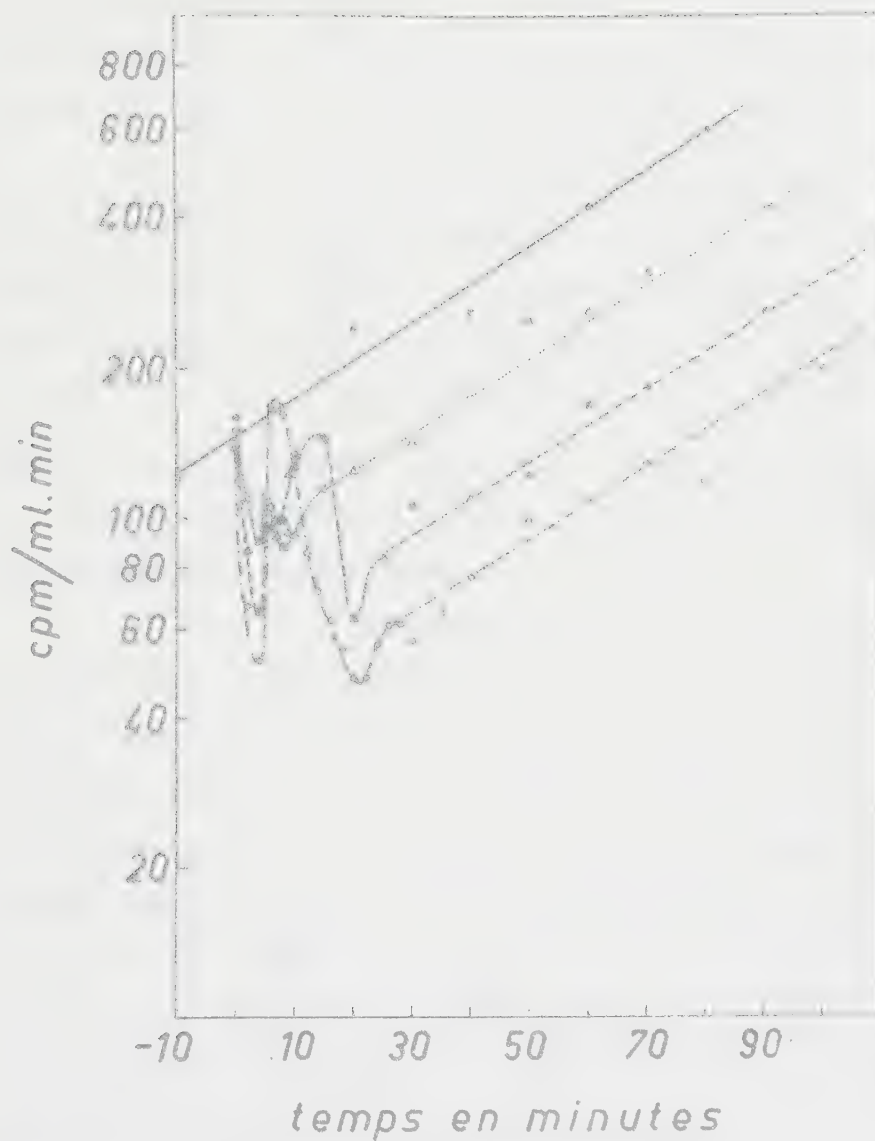


Fig. 7

Taux d'incorporation de C^{14} Thymidine dans la souche 1559(L) infectée avec P22 w.t. (O . . . -O), P22 $L_{H1} P_{H2}$ (▲-----▲) et P22 $L_{H1} L_{H2}$ (△.....△). Contrôle non-infecté (●—●).

Il semble donc que les courbes traduisent bien des taux différents de synthèse du DNA dans les cellules survivantes. De plus, le pourcentage des double-lysogènes parmi les survivants étaient pour P22 1,5%, pour P22 ^LH1 3% et pour P22 ^LH1 ^LH2 49% (Tableau 3). Dans les trois cas le nombre de bactéries productrices de phages était insignifiant.

On a vu que dans l'infection mixte de la souche 1559 par P22 C₁ et L C₁, ^PH est récessif par rapport à ^LH et que ce dernier peut fournir la fonction nécessaire à la croissance de P22. La figure 8 montre une courbe du taux de synthèse du DNA de la souche 1559 infectée par P22 C₁ et L C₁ en égale multiplicité d'infection (10 pour chacun des phage). Cette courbe est comparable à celle de LT2 infectée par P22 C₁. Le rendement des phages était normal (200 phages/bactéries) avec une quantité égale de chaque parent.

La question se posait de savoir si les produits H agissaient sur une inhibition du DNA spécifique ou non-spécifique. Dans les conditions d'immunité, où le phage infectant est inhibé, on observe encore une inhibition du DNA (Fig. 9); cette inhibition non-spécifique est comparable à celle produite par T4 sur E. coli CO 270 (Luria, 1964) et serait due à l'adsorption de n'importe quel phage. Pour savoir si les produits H agissent sur cette inhibition non-spécifique ou sur une autre inhibition, des expériences d'incorporation de C¹⁴ Thymidine ont été faites en présence de chloramphénicol (CAP) comme inhibiteur de la synthèse des protéines pour supprimer la fabrication des répresseurs spécifiques. Le chloramphenicol a été ajouté à différents temps après l'infection pour suivre l'apparition éventuelle d'un répresseur spécifique.

TABLEAU 3

Mesure des double-lysogènes obtenus par infection de 1559(L) par P22
et ses recombinants porteurs des allèles ^LH

Souches infectées avec:		Bactéries		(a) Bactéries survivantes à		%		:		Remarques
une multiplicité d'in-		survivantes		l'infection et testées par		double-		:		
fection de 5		: % cell.inf.		réplique sur		:lysogènes:				
		:		:LT2 LT2(L) 1559 LT2(P22 18):						
1559(L) + P22		43	198	3	3	(b)	-	(c)	1,5	
1559(L) + P22 ^L H1		42	200	6	6		-		3	
1559(L) + P22 ^L H1 ^L H2		38	200	98	98		-		49	
LT2(L) + P22		(1) 14	199	150	180		136	9		+ 15% de recombinants
		(2) (d) 44	199	195	119		114	40		2% de substitution de L par P22. 2% de recombinants
LT2 (e) (P22 18) + L		98	200	181	181		181	90		9% de substitution des prophages P22 par L
1559 (f) (P22) + L		35	200	77	89		-	38		6% de substitution de P22 par L

(a) Après infection, les bactéries survivantes étaient isolées, puis testées par réplique sur les différents indicateurs qui étaient tous lysés par les double-lysogènes, P22 lysant 1559 et LT2(P22 18) et L lysant 1559. Par exemple, dans le premier test (1559(L) + P22), sur 198 survivants lysogènes (lyse sur LT2) 3 lysaient aussi LT2(L) et 1559, ce qui donne 1,5% de double-lysogènes. Lorsque les chiffres sur LT2(L), 1559 et LT2(18) ne correspondaient pas, cela signifiait que certains prophages étaient des recombinants entre P22 et L, ou bien que le prophage de la bactérie avait été substitué par le phage surinfectant.

(b) Signifie que le test n'a pas été fait.

- (c) A 80' après l'infection, la production de phage était d'environ 0,2 à 0,7 phage pour 1 survivant. Le nombre de bactéries productrices de phages est donc insignifiant.
- (d) Dans une expérience à plus basse m.o.i. (2), le taux de survivants correspondait à peu près à celui des autres essais. On voit alors que la double-lysogénisation est de 40%, ce qui correspond aux autres contrôles.
- (e) P22 18 est un double mutant ts. L'expérience a été faite à 25°. Il semble que ce prophage soit particulièrement stable.
- (f) Il est intéressant de noter que 1559(P22) ne présente pas d'exclusion de phages surinfectants comme LT2(P22). (cf. mutant sie, p. 4).

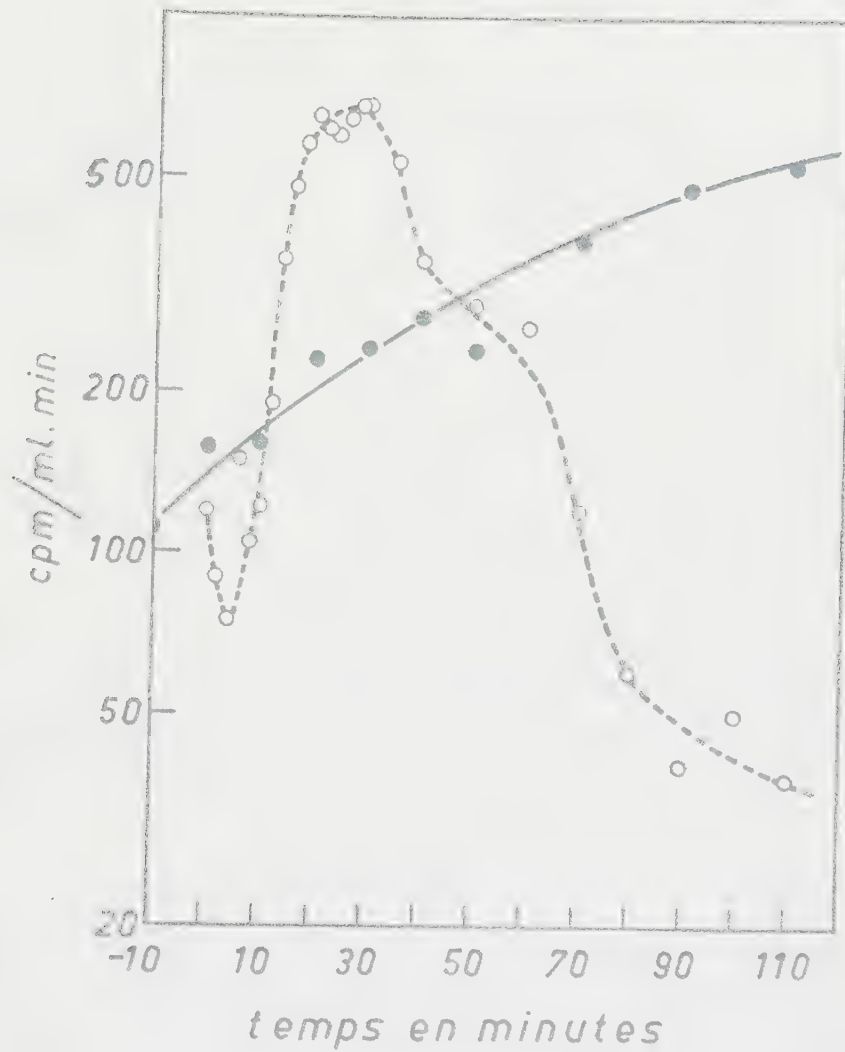


Fig. 8

Taux d'incorporation de C^{14} Thymidine dans la souche 1559 infectée par P22 C_1 et L C_1 (O.....O). Contrôle non-infecté (●——●).

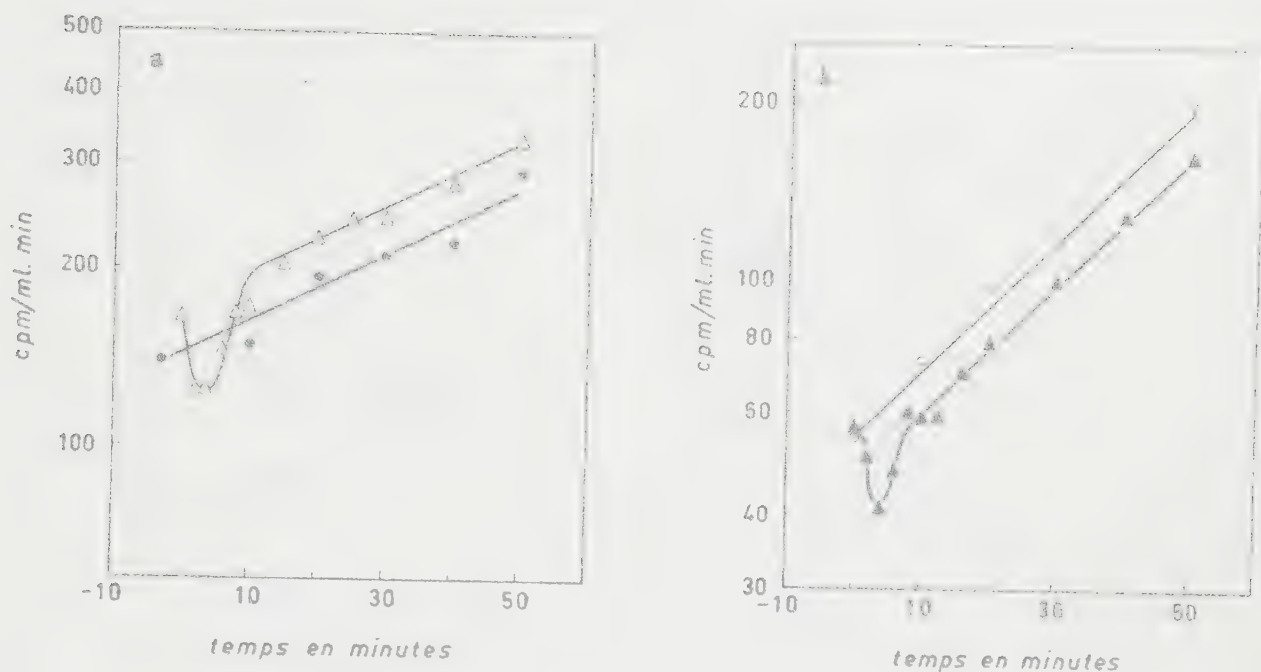


Fig. 9

Taux d'incorporation de la C^{14} Thymidine dans la souche a) LT2(L) (Δ — Δ) et b) 1559(L) ($\triangle$ — $\triangle$) infectées par L. Contrôles non-infectés (O—O), (●—●).

Lorsque le CAP est ajouté au temps 0 de l'infection, aucune différence significative n'a été observée entre les bactéries 1559 infectées avec des phages porteurs des allèles P_H ou L_H (Fig. 10); de plus, dans les deux cas, le taux de synthèse du DNA, après un premier abaissement assez court, rejoignait exactement la courbe du contrôle. Ceci exclut la possibilité que les produits H agissent sur une inhibition non-spécifique causée par l'adsorption des phages puisque cette inhibition ne dure pas même en l'absence de tout produit H.

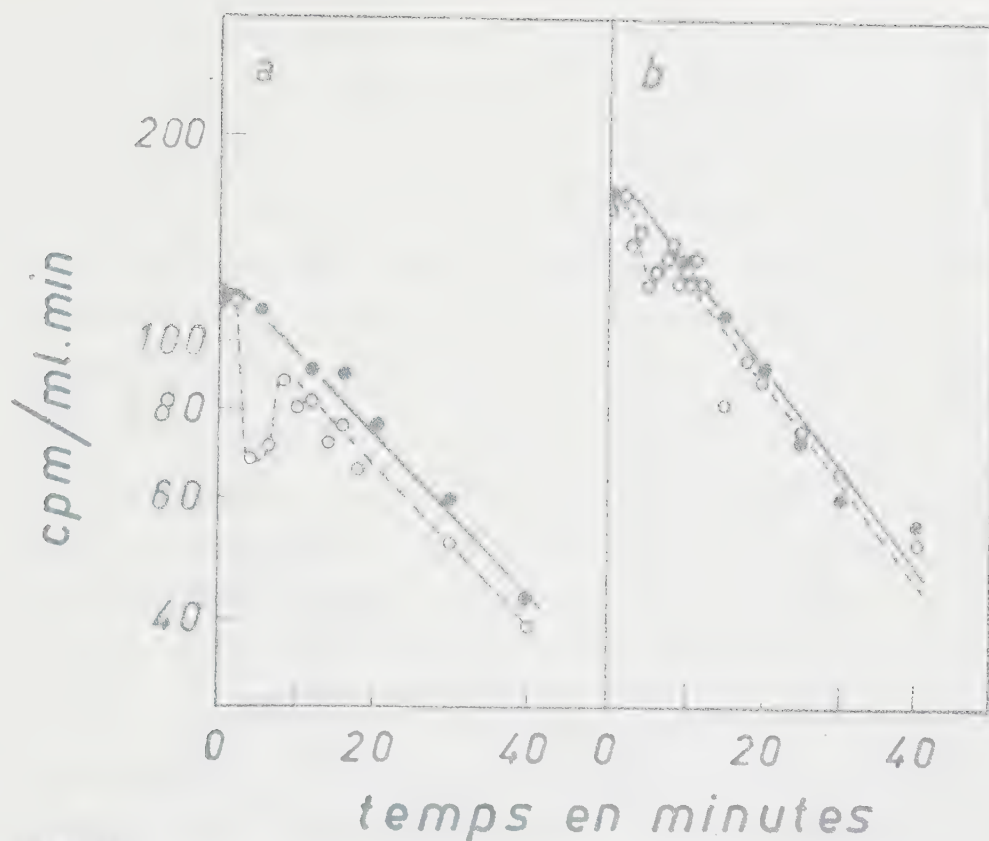


Fig. 10

Taux d'incorporation de la C^{14} Thymidine dans la souche 1559 infectée par P22 (a) et L (b) en présence de 200 $\mu\text{g/ml}$ de Chloramphenicol. Cellules infectées (O.....O). Contrôle non-infecté (●——●).

Lorsque le CAP est ajouté à différents temps après l'infection (Fig. 11 a) on observe que jusqu'à trois minutes après l'infection, l'inhibition produite par le phage peut être évitée puisque les courbes rejoignent les courbes de contrôle sans infection. Entre trois et six minutes, les conditions de la synthèse du DNA changent puisque l'inhibition des protéines produit une chute spectaculaire des taux de synthèse du DNA.

Lorsque LT2 est infectée par P22 C₁ (Fig. 11 b), on observe une inhibition similaire après 3 minutes sauf que le taux de synthèse du DNA rejoint le taux de synthèse du contrôle non-infecté. On peut expliquer ces courbes ainsi: le CAP inhibirait la synthèse des DNA bactérien et phagique à des taux spécifiques différents. On sait que l'inhibition des protéines permet la fin des cycles de replication du DNA déjà commencés, mais empêche la réinitiation (Majó et Hanawalt, 1962) ce qui expliquerait l'inhibition différente du DNA de la bactérie et du DNA beaucoup plus court du phage (Amati, 1969). Par conséquent, jusqu'à 3 minutes après l'infection, on observe seulement l'effet du CAP sur le DNA bactérien. Après 3 minutes, si l'infection est faite avec des gènes H en fonction (comme P22 sur LT2), on observe une inhibition de la synthèse du DNA phagique. Lorsque les gènes H ne fonctionnent pas normalement (P22 sur 1559) on observe une inhibition de la synthèse du DNA phagique superposée à celle de l'hôte provoquée par le phage. Il semble que les gènes H agissent bien sur une inhibition spécifique de l'hôte.

Résumé:

Les produits H contrôlent une inhibition spécifique du DNA des cellules infectées. Ce contrôle agit à la 12ème minute après l'infection. Cet effet peut être primaire ou dépend lui-même d'une autre inhibition. L'étude des taux de synthèse du RNA ou des protéines pourra répondre à cette question.

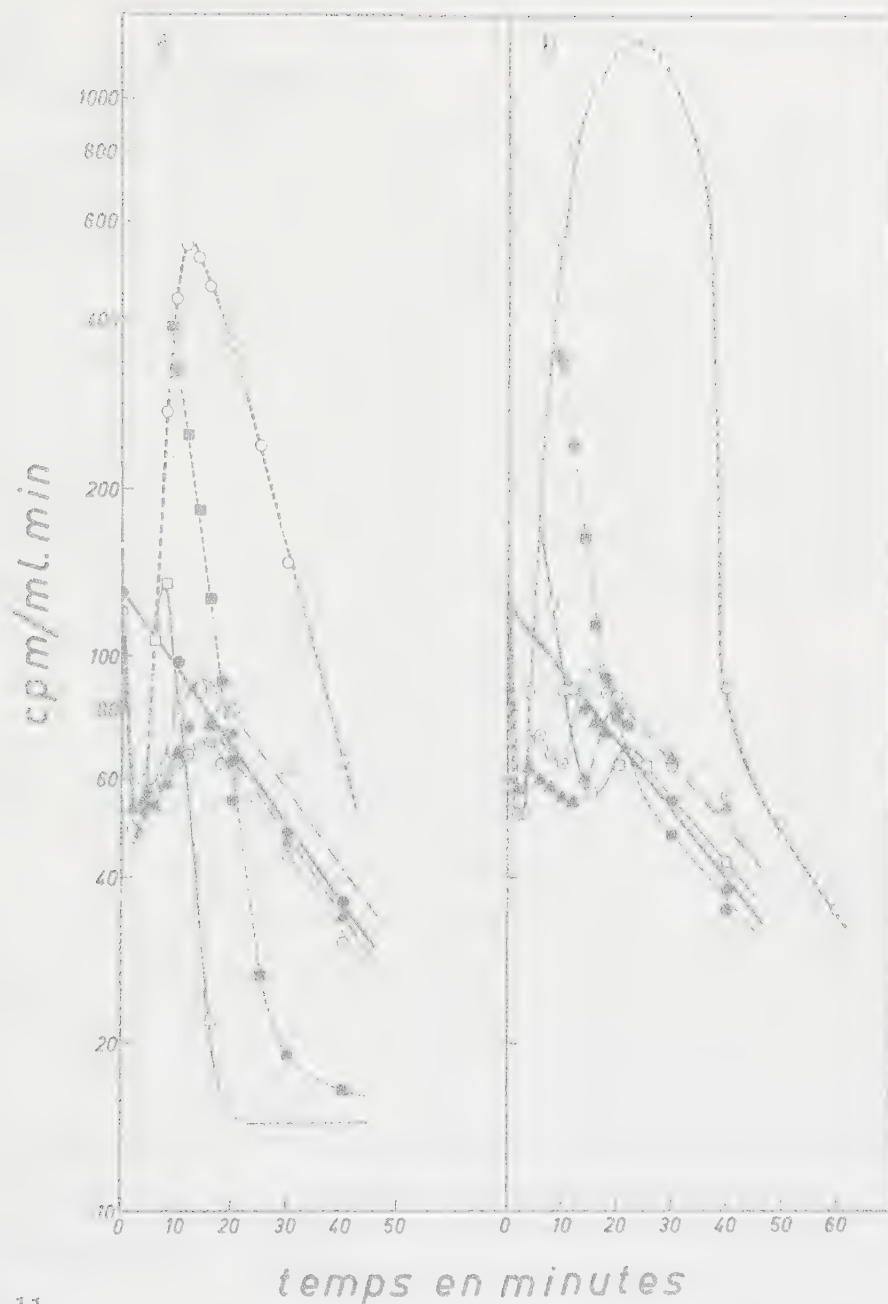


Fig. 11

Taux d'incorporation de la C^{14} Thymidine dans les souches 1559 (a) et LT2 (b) avec addition de 200 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphenicol à différents temps après infection par P22 C_1 (O.....O) cellules infectées sans CAP; ($\blacktriangle$ $\blacktriangle$) cellules infectées avec CAP ajouté à 0 minute; ($\triangle$ $\triangle$) cellules infectées avec CAP ajouté à 2 minutes; ($\odot$ $\odot$) cellules infectées avec CAP ajouté à 3 minutes; ($\square$ $\square$) cellules infectées avec CAP ajouté à 6 minutes; ($\blacksquare$ $\blacksquare$) cellules infectées avec CAP ajouté à 9 minutes; ($\bullet$ $\bullet$) cellules non-infectées avec CAP à 0 minute.

Taux de synthèse du RNA

La figure 12 montre les taux de synthèse du RNA après l'infection de 1559 avec P22 ou L. Dans une infection normale, l'inhibition du RNA consécutive à l'infection se termine entre la 6^e et la 8^e minutes et le taux de la synthèse rejoint rapidement une droite parallèle au contrôle non infecté. Dans le cas de l'infection abortive de 1559 par P22, l'inhibition primaire du RNA se termine un peu plus tard, le taux de synthèse du RNA, après une brève augmentation, présente une diminution continue et considérable par rapport au contrôle. Cette inhibition prend place environ 10 minutes plus tard que celle du DNA; par conséquent elle doit être un effet secondaire à l'inhibition du DNA.

L'étude du taux de synthèse du RNA dans la souche 1559 infectée par P22 en présence de CAP a confirmé les résultats obtenus pour la synthèse du DNA dans les mêmes conditions.

La figure 13 montre les courbes d'incorporation d'uracil-¹⁴C dans la souche 1559 infectée avec P22 C₁, avec adjonction de CAP à différents temps après l'infection. Jusqu'à la 4^e minute l'inhibition due au phage peut être évitée; de 5 à 10', plus tard le CAP est ajouté, plus forte est l'inhibition. Ces courbes semblent bien suivre celles du DNA obtenues dans les memes conditions, avec un léger retard de l'inhibition du RNA par rapport au DNA. Ce léger retard confirme l'effet indirect du marqueur H sur le RNA.

Résumé:

L'effet des marqueurs H sur la synthèse du RNA est secondaire à l'inhibition de la synthèse du DNA.

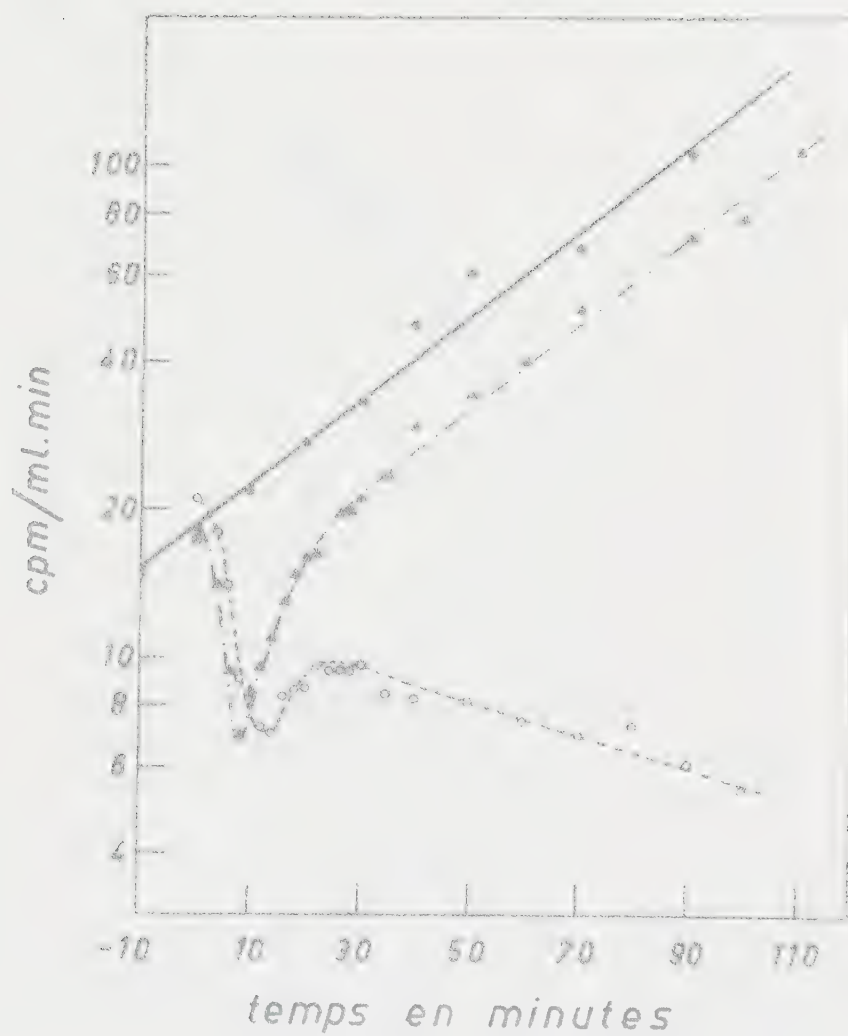


Fig. 12

Taux d'incorporation d'uracil-¹⁴C dans la souche 1559 infectée avec les phages P22 (○.....○) et L (▲.....▲). Contrôle non-infecté (●.....●).

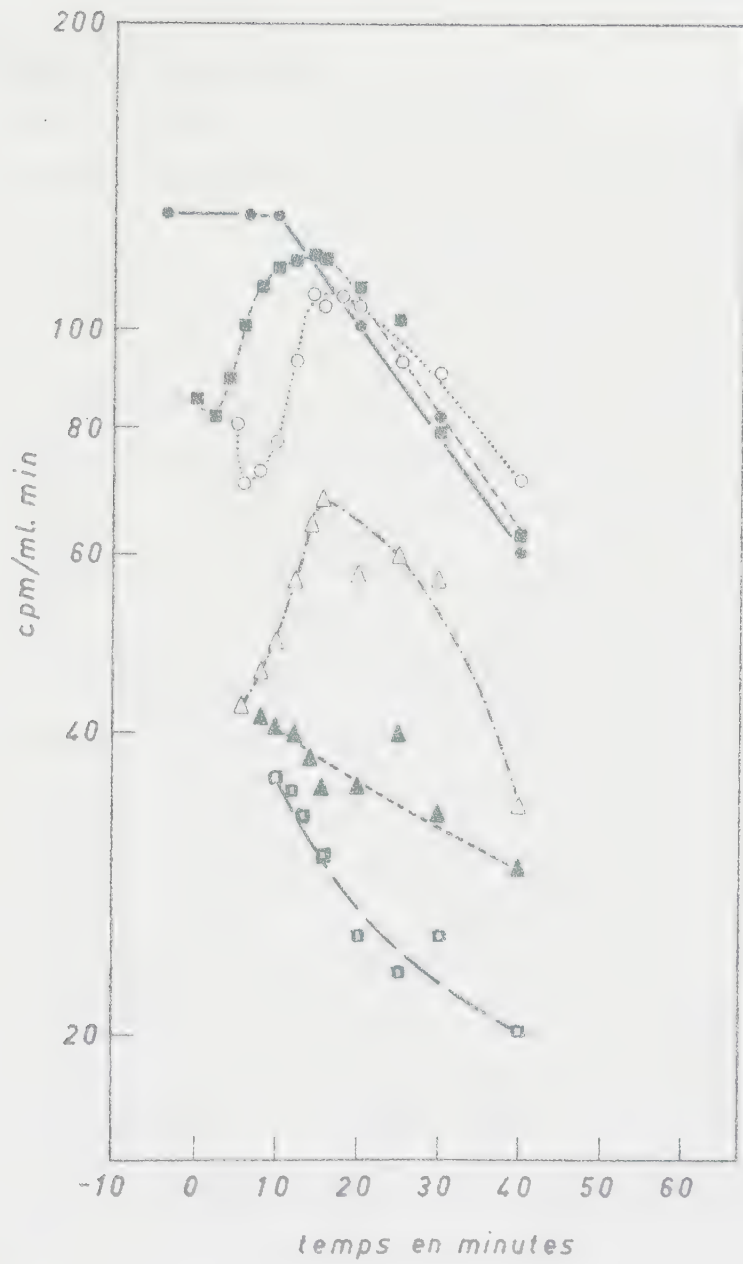


Fig. 13

Taux d'incorporation d'uracil-¹⁴C dans la souche 1559 infectée avec P22 avec adjonction de CAP à 0' (■—■) à 4' (○.....○), à 6' (Δ-.-.-Δ), à 8' (▲-----▲) et à 10' (□——□) après l'infection. Contrôle non-infecté avec CAP (●——●).

Taux de synthèse des protéines

Cohen et Levine (1966) ont observé un abaissement de l'incorporation d'un précurseur radioactif des protéines tout de suite après l'infection de LT2 par P22. Une étude détaillée de la cinétique du taux de synthèse protéinique des souches LT2 et 1559 infectées avec P22 et L est représentée sur la figure 14 a, b et c. On voit que dans une infection normale (LT2 infectée par P22 et L, ou 1559 infectée par L), la courbe du taux de synthèse des protéines rejoint une parallèle à celle du contrôle non-infecté après une première inhibition passagère d'environ 8'. Lors de l'infection abortive de la souche 1559 par P22, on observe une chute abrupte de la synthèse des protéines. Cette inhibition commence à 8 minutes après l'infection, ou avant, puisque dans l'infection normale le taux de synthèse recommence à augmenter à partir de ce moment, après une première inhibition indépendante du phage infectant. Cette première inhibition n'apparaît pas dans une souche lysogène infectée avec un phage homoimmun (Fig. 15).

Les recombinants P22 ^LH1 ^PH2 et P22 ^LH1 ^LH2 ont été comparés avec le P22 w.t. Sur la figure 16 on peut voir que seul le P22 porteur des deux allèles ^LH ne provoque pas l'inhibition de la synthèse des protéines alors que l'inhibition de la synthèse du DNA par P22 ^LH1 ^PH2 est partiellement relâchée par rapport au P22 w.t. Il est intéressant de comparer ces courbes à celles obtenues sur la souche 1559 lysogène pour L infectée avec les mêmes phages d'immunité P22 (Fig. 17). Dans ce cas, après un certain retard, P22 ^LH1 ^PH2 est capable de restaurer la synthèse des protéines, ce qui démontre une complémentation très efficace du marqueur H2 de P22 par celui du prophage. Une autre particularité de ces courbes consiste en une pente intermédiaire de la courbe du taux de synthèse, avant que cette courbe

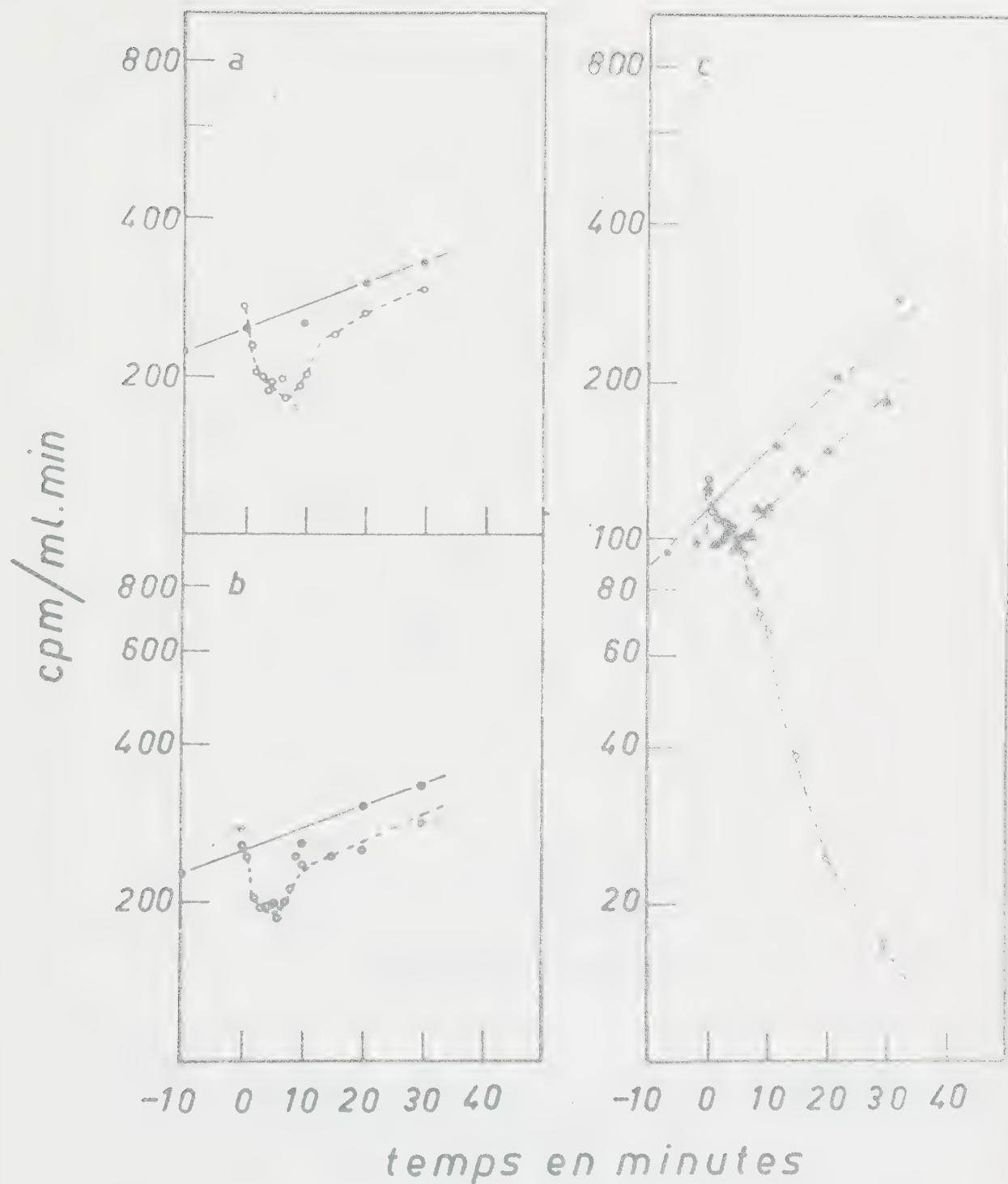


Fig. 14

Taux d'incorporation de ^{14}C Leucine dans les cellules infectées: (a) et (b) souche LT2 infectée avec les phages P22 (a) et L (b). (c): souche 1559 infectée avec P22 (○.....○) et L (▲.....▲). Contrôles non-infectés (●.....●).

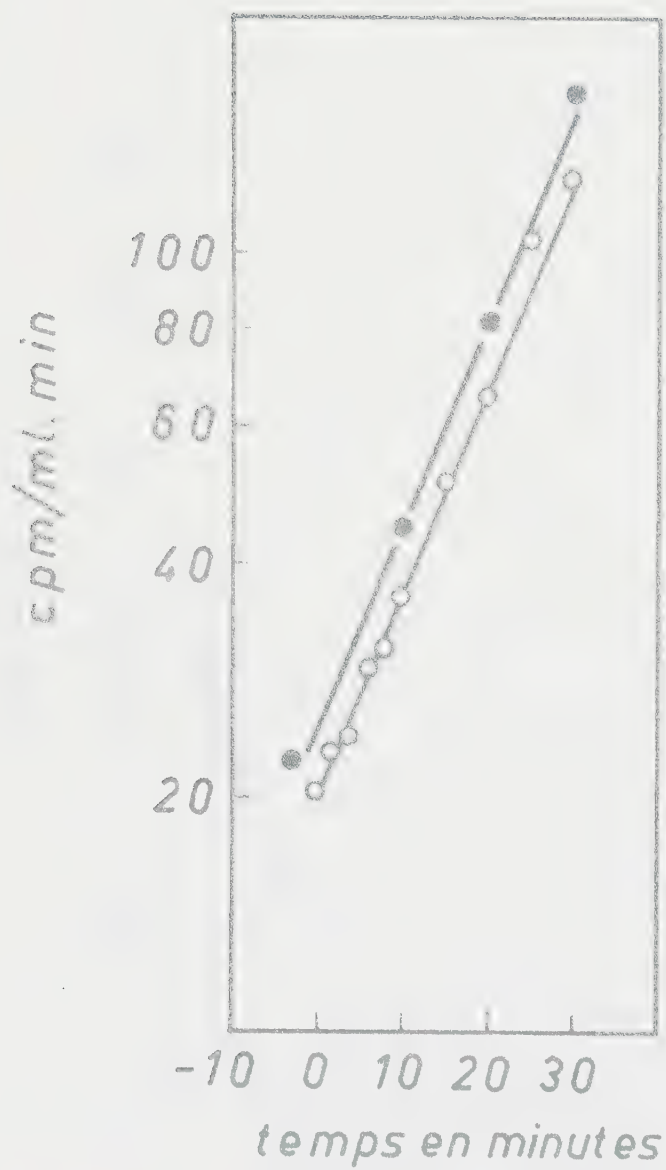


Fig. 15

Taux d'incorporation de C^{14} Leucine dans 1559(L) infectée avec L (○.....○). Contrôle non-infecté (●——●).

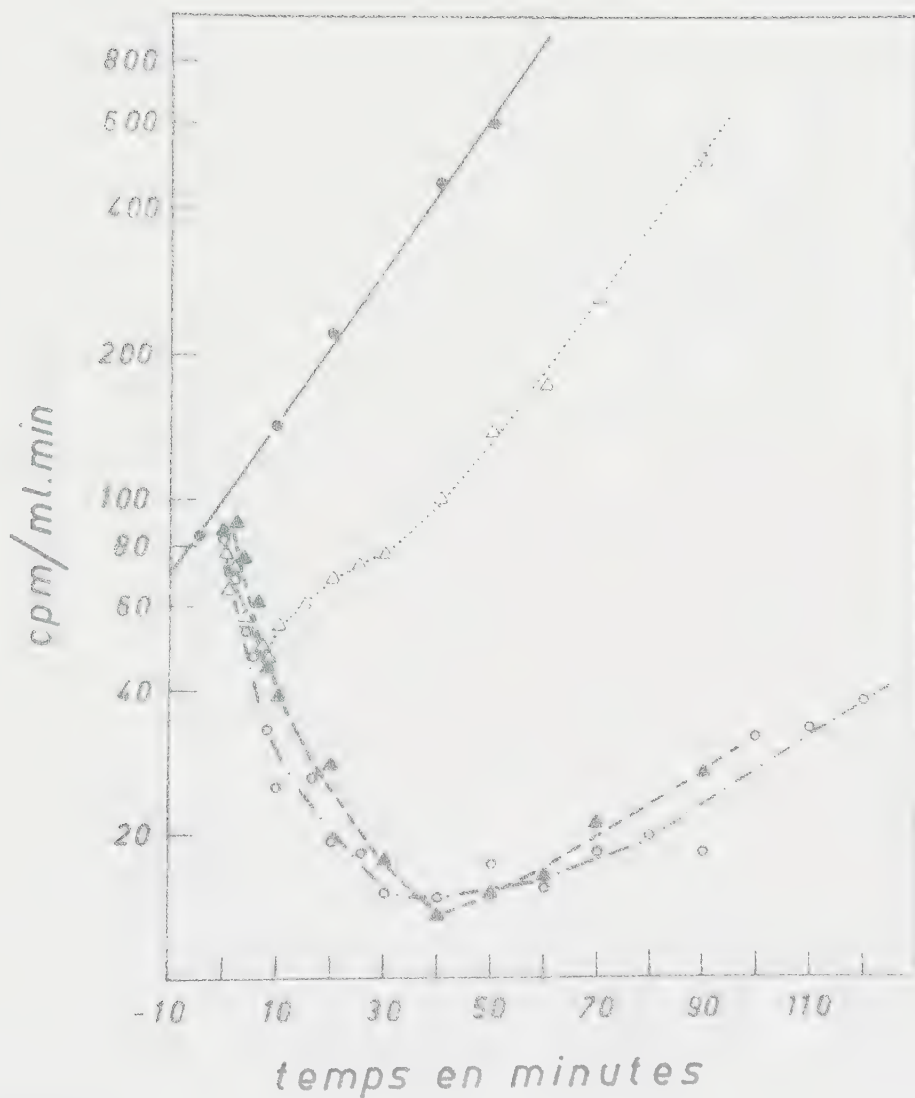


Fig. 16

Taux d'incorporation de C^{14} Leucine dans la souche 1559 infectée avec les phages P22 w.t. (O-.-.-.O), P22 $L_{H1} P_{H2}$ ($\blacktriangle$ ----- $\blacktriangle$) et P22 $L_{H1} L_{H2}$ ($\triangle$ $\triangle$). Contrôle non-infecté ($\bullet$ ----- $\bullet$).

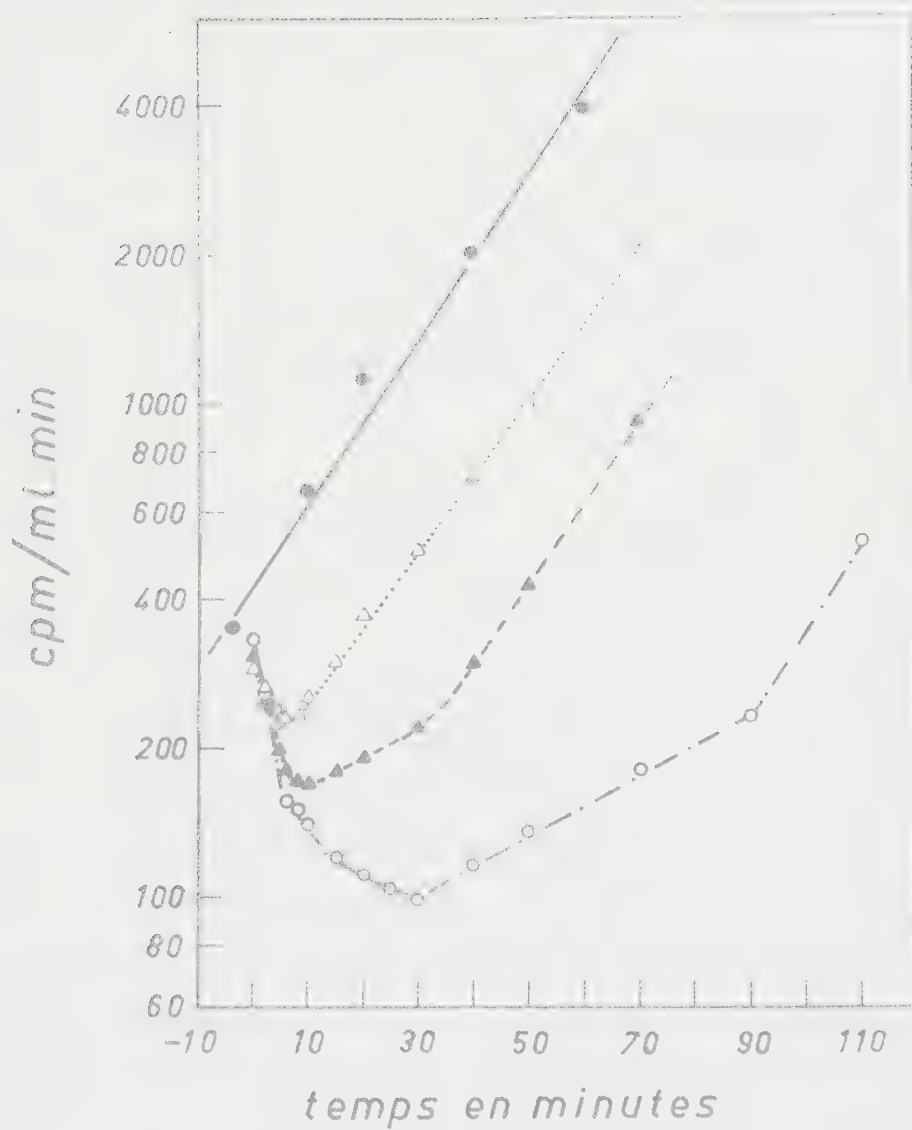


Fig. 17

Taux d'incorporation de C^{14} Leucine dans la souche 1559(L) infectée avec les phages P22 w.t. (○.....○), P22 $^{\text{L}}_{\text{H1}}$ $^{\text{P}}_{\text{H2}}$ (▲.....▲) et P22 $^{\text{L}}_{\text{H1}}$ $^{\text{L}}_{\text{H2}}$ (Δ.....Δ). Contrôle non-infecté (●—●).

ne rejoigne une parallèle au contrôle. Ceci pourrait traduire une période d'un taux intermédiaire de synthèse qui durerait le temps nécessaire à une complémentation suffisante des gènes P^H par les gènes L^H . Le fait que P22 w.t. présente une courbe intermédiaire plus longue que celle de P22 $L^H P^H$ H2 serait en faveur de cette explication.

La figure 18 montre les courbes d'incorporation de mutants C_1 et $C_1 C_2$. P22 $C_1 C_2$ et P22 $L^H C_1$ se comportent comme P22 w.t., alors que lorsque P22 porte les deux allèles L^H , il produit une infection lytique normale.

Synthèse des protéines in vitro

Il était intéressant de savoir si l'inhibition de la synthèse des protéines observée après l'infection de la souche 1559 par le phage P22 était la conséquence de l'inactivation de quelque facteur spécifique du système de synthèse des protéines. Une étude de ce système a été faite par une synthèse in vitro de protéines par des extraits de 1559 infectée par P22, L et leurs recombinauts et en utilisant comme RNA messenger du Poly U ou du RNA du phage MS2. Des extraits de 1559 infectée par les différents phages furent obtenus en rompant les cellules par sonication, après 20 minutes d'incubation à 37°. Ces extraits furent mis en présence de RNA messenger dans un mélange de réaction contenant de la phenylalanine radioactive. L'incubation à 35° a duré 30 minutes. Les résultats de la synthèse de protéines in vitro sont reportés dans le Tableau 4; elle a été mesurée par l'incorporation de C^{14} Phenylalanine dans le matériel précipité en TCA chaud.

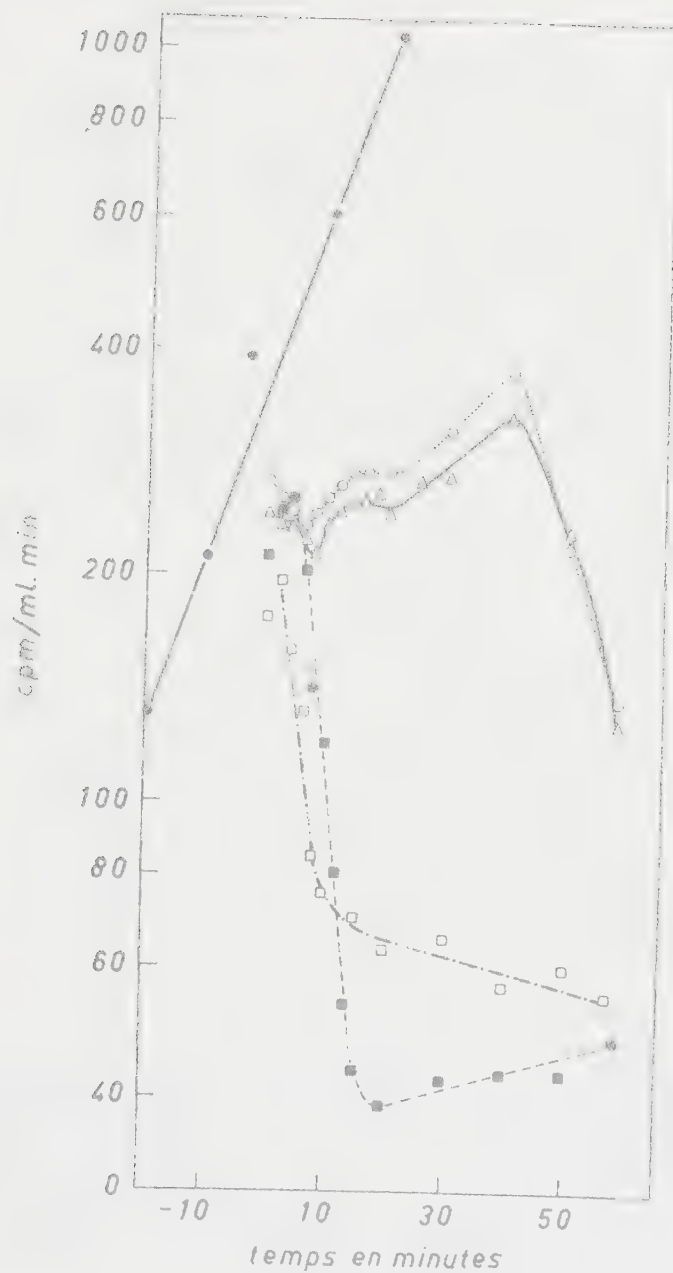


Fig. 18

Taux d'incorporation de C^{14} Leucine dans 1559 infecté avec P22 C₁ C₂ (□ — □), P22 L_{H1} C₁ (■ — ■), P22 L_{H1} L_{H2} C₁ (○ — ○) et P22 L_{H1} L_{H2} C₁ C₂ (△ — △). Contrôle non-infecté (● — ●).

TABEAU 4

Synthèse in vitro des protéines par des extraits
de 1559 infectée par différents phages.

Extraits de la souche 1559 infectée avec les phages	Mélange de réaction plus		
	rien	Poly U	MS2 RNA
L	80	1517	242
P22	93	1517	317
P22 c_2	70	1040	244
P22 L_{H1}	86	600	165
P22 $L_{H1} L_{H2}$	140	727	253
non infectée	52	330	127

Le tableau montre l'incorporation in vitro de C^{14} Phenylalanine dans le matériel précipitable dans du TCA chaud. Le système de synthèse des protéines utilise comme messenger du Poly U ou du RNA phagique MS2. Les valeurs obtenues sont données en coups par minute par mg de protéines.

Le mélange de réaction est défini dans Matériels et Methodes.

Les résultats montrent clairement que l'effet inhibiteur de P22 sur la synthèse des protéines de la souche 1559 n'est pas une inactivation stable d'un facteur cellulaire nécessaire à la synthèse in vitro des protéines. En effet, on n'observe pas de différence significative dans l'activité in vitro des extraits des différents complexes infectés, comme c'est le cas pour l'action de la colicine E3 (Nomura, 1963; Nomura et Maeda, 1965), où une altération de la sous-unité ribosomale 30^S a pu être découverte (Kenisky et Nomura, 1967).

Résumé:

La synthèse des protéines de la souche 1559 est inhibée par les produits ^PH à partir de la 8^e minute. C'est donc sur les protéines que ces produits ^PH agissent en premier, et l'inhibition du DNA suit plus tard, de même que celle du RNA. Aucun composant du système de synthèse des protéines n'est altéré de façon stable.

Etude de la viabilité des bactéries lors de l'infection abortive

Des brusques changements de température à différents temps après l'infection de 1559 par un mutant ts de P22 devaient permettre de savoir quand le complexe infecté avait perdu sa viabilité en l'absence des fonctions H. En effet, un mutant ts d'une fonction précoce de P22 ne tue plus la souche 1559 dans des conditions non permissives (culture à 42°), alors que l'infection abortive a lieu dans des conditions permissives (culture à 32°) (Amati, communication personnelle). En changeant la température de culture des bactéries infectées de 32° à 42°, on pouvait étudier leur viabilité, et inversement, en passant de 42° à 32°, on pouvait connaître celle du phage infectant.

Le mutant P22tsB23 ne produit pas de DNA; il convenait donc pour les expériences de changements de température puisqu'il ne doit rien produire dans des conditions non permissives. Un contrôle des synthèses du DNA des complexes infectés a été fait avant d'étudier la synthèse des protéines, plus adéquate puisque c'est celle qui est la première affectée lors de l'infection abortive.

La figure 19 montre les courbes de synthèse du DNA de la souche 1559 infectée par P22tsB63 dans les conditions permissives (culture à 32°) et non permissives (culture à 42°).

A 42°, on observe une première inhibition de la synthèse du DNA bactérien; le taux de synthèse rejoint une courbe parallèle au contrôle, après 20'. A 32°, l'inhibition du DNA est comparable à celle obtenue avec P12 w.t.

L'étude du taux de synthèse des protéines de 1559 infectée par P22tsB63 et inhibée à 32° et 42° est représentée par les courbes de la figure 20a. Sur cette figure, on observe une inhibition très nette de la synthèse des protéines à 32°, inhibition qui semble cependant se relâcher quelque peu après la trentième minute. La figure 20b montre la cinétique de la synthèse des protéines de la souche 1559 infectée par P22tsB63 à 42° et à 32°. Dix et vingt minutes après l'infection, une partie de la culture à 42° a été transférée à 32°. De même, 20' après l'infection, une partie de la culture à 32° a été transférée à 42°. Les courbes d'incorporation de C¹⁴ Leucine obtenues démontrent que vingt minutes après l'infection, les bactéries infectées n'ont pas subi d'altérations irréversibles. En effet, l'inhibition provoquée par le phage peut encore être obtenue après vingt minutes (changement de 42° à 32°) et les synthèses des protéines des bactéries infectées reprennent immédiatement après un transfert dans des conditions non permissives pour le phage. La mort des bactéries 1559 ne

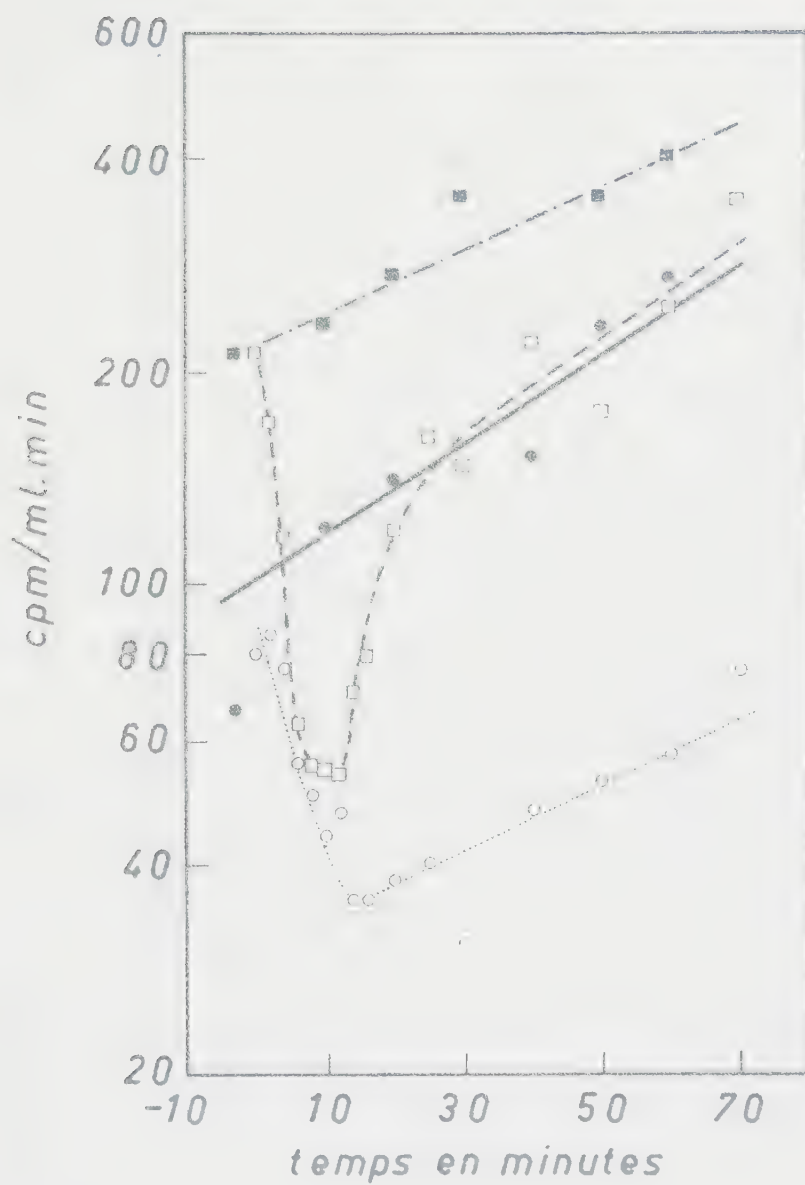


Fig. 19

Taux d'incorporation de C^{14} Thymidine dans 1559 infecté avec P22tsB63 à 32° (○—○) et à 42° (□—□). Contrôles non-infectés (●—●) et (■—■).

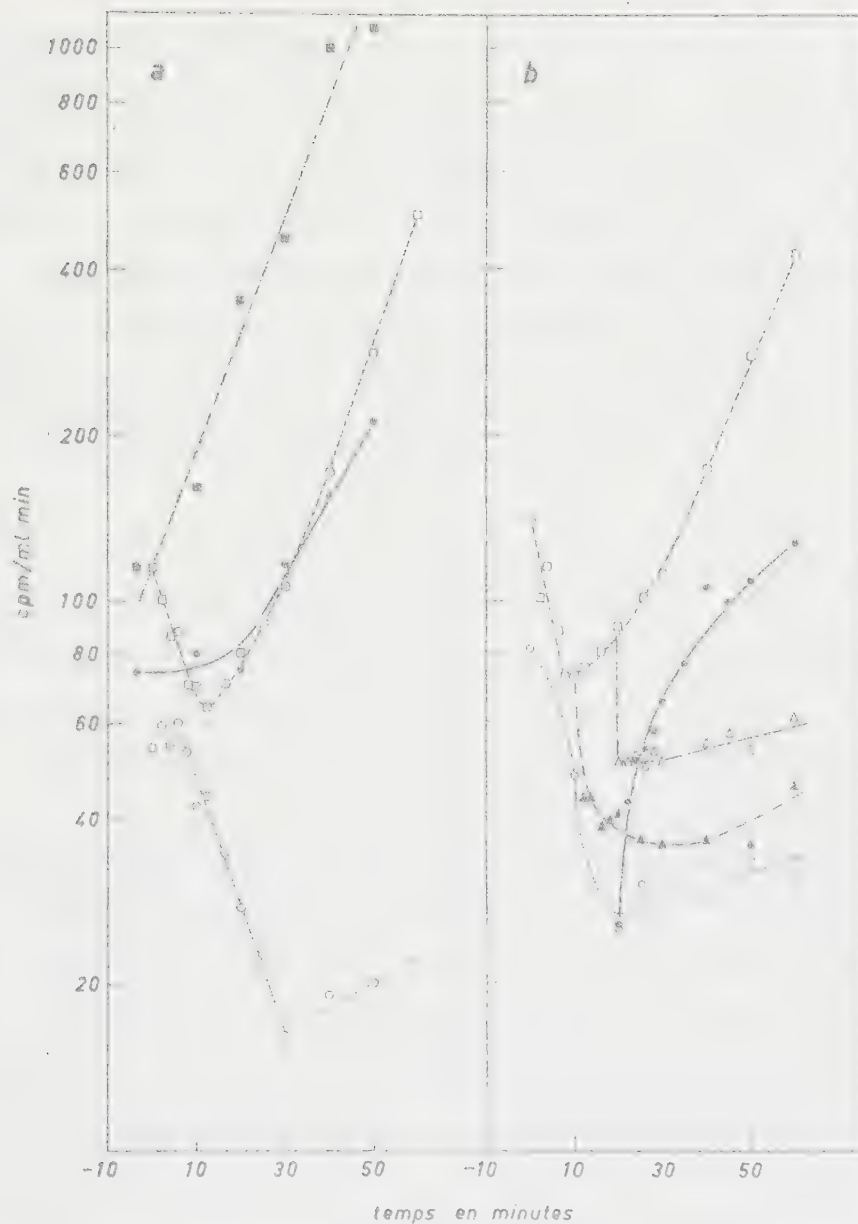


Fig. 20

Taux d'incorporation de C^{14} Leucine dans 1559 infecté avec P22tsB63 a) à 32° (○.....○) et à 42° (□-----□). Contrôles non-infectés (●-----●) et (■-.-.-.■). b) à 32° (○.....○) et à 42° (□-----□). Changements de température de 42° à 32° après 10' (▲-.-.-.▲) après 20' (Δ-----Δ), de 32° à 42° après 20' (●-----●).

suit donc pas immédiatement après l'infection par P22, et des fonctions H déficientes ne sont pas directement létales. On peut comparer la mort des bactéries infectées à celle provoquée par un agent bloquant la synthèse des protéines, comme le chloramphenicol.

Ces expériences démontrent en outre que le DNA phagique doit se répliquer normalement pour que la restriction aie lieu, ce qui confirme les expériences avec le chloramphenicol qui impliquent la formation active par le phage d'un inhibiteur des protéines.

Résumé:

Vingt minutes après l'infection de 1559 par P22, les bactéries infectées sont encore viables; dans des conditions non permissives, le génome phagique est aussi intact.

Des fonctions H déficientes ne sont donc pas directement létales.

Rôle de la cellule dans l'infection abortive de 1559 par P22

Bezdek et Amati (1967) ont démontré que l'état physiologique de l'indicateur 1559 influençait l'efficacité d'étalement de P22 sur cette souche. Une culture en croissance exponentielle permet une efficacité d'étalement d'environ 10^{-2} , alors que la culture stationnaire ou carencée (en tampon phosphate une heure à 37° avec aération) donne des valeurs variant entre 10^{-3} et 10^{-5} .

On pouvait penser que certains mutants de 1559 pourraient perdre la restriction pour P22 et restaurer une efficacité d'étalement de P22 égale à 1. Deux sortes d'essais ont été faits pour obtenir ces mutants: le "curing" de 1559 (P22), au cas où le marqueur responsable de la restriction serait proche de l'attachement de P22, devait permettre d'isoler une souche sensible ayant perdu le marqueur de la restriction pour P22 en

même temps que le prophage. Une mutagénisation de 1559 par la nitrosoguanidine était une autre possibilité.

La difficulté consiste à isoler de tels mutants car il n'existe pas de moyens de sélection pour les reconnaître. En effet, la replication de colonies isolées sur des boîtes contenant des phages virulents (P22 C₁ C₂) ne donne pas le résultat attendu. En présence de P22 C₁ C₂ la souche 1559 présente des zones de lyse, alors qu'une souche sans restriction croît aussi partiellement. Il est donc très difficile de reconnaître un mutant ayant perdu la restriction et le seul moyen consiste à isoler et tester un grand nombre des colonies qui présentent le plus de lyse en présence de phages.

a) Curing: Après une exposition aux UV de 1559 (P22), les bactéries survivantes ont été répliquées sur des boîtes contenant 10^9 P22 C₁ C₂. 350 souches "douteuses" ont été testées pour la restriction de P22, par efficacité d'étalement. Une souche sensible à P22 ne présentant plus de restriction pour ce phage fut trouvée. P22 avait une efficacité de 1 à 1,3 sur cette souche, appelée 1559 S. Trois autres souches présentaient une efficacité d'étalement de environ 0,1 pour P22.

b) Mutagénisation de 1559 par la nitrosoguanidine: Après traitement à la nitrosoguanidine, 340 souches "douteuses" sur répliques avec P22 C₁ C₂ ont été testées. Une souche sans restriction pour P22 a été trouvée, appelée 1559 N. Sur trois autres souches, l'efficacité d'étalement variait de 0,1 à 0,3.

Les deux souches 1559S et 1559N sont prototrophes, comme 1559. L'efficacité d'étalement de L, de P22 et de leurs recombinants correspond à celle obtenue sur la souche LT2.

Il semble donc bien que la restriction de P22 soit contrôlée par la cellule et les gènes responsables de ce contrôle agiraient soit au niveau des gènes H, soit directement sur leur produit.

Transduction

Les résultats précédents démontrent qu'un ou des marqueurs bactériens de 1559 sont impliqués dans la restriction de P22.

Pour essayer de localiser ces marqueurs sur la carte génétique de *Salmonella typhimurium*, il aurait fallu pouvoir faire des expériences de conjugaison ou de transduction. Comme il n'existe pas de moyens de sélection directe d'une souche portant les marqueurs de restriction les expériences de conjugaison et de transduction simples ont été abandonnées. Il restait la possibilité d'étudier la co-transduction des marqueurs de la restriction avec un marqueur facilement sélectionné. Comme le "curing" de 1559 (P22) avait permis d'isoler un mutant sans restriction, on pouvait supposer que les marqueurs de la restriction se trouvaient près du site d'attachement de P22 (att. P22). Att P22 est lui-même proche des sites pro A B C et co-transduit avec eux; il était donc possible que les marqueurs de la restriction soient aussi co-transduits avec le groupe att. P22 - pro A B C. Des expériences de co-transduction ont alors été faites, en utilisant le marqueur pro comme repère. Les transductants pro⁺ étaient ensuite testés pour la restriction à P22.

Le phage L a été utilisé pour transduire le marqueur proline de la souche 1559 à trois souches de LT2 proA, proB et proC.

600 transductants proline⁺ ont été isolées. Une vingtaine de colonies pro⁺ résistantes à P22 ont été isolées. Bien que l'adsorption ait été normale, cette résistance n'avait rien à voir avec la restriction, pour les raisons suivantes: a) la majorité des bactéries n'étaient pas tuées après l'infection par P22; b) l'analyse de la synthèse des protéines de six transductants résistants n'a pas montré l'inhibition caractéristique suivant l'infection par P22; c) tous les transductants étaient lysogènes pour L; dans le cas de la restriction on aurait dû observer l'effet d'aide

et avoir une efficacité d'étalement de P22 de 1 à 10%, alors qu'elle était inférieure à 10^{-5} .

Il semble donc que la co-transduction de la restriction de P22 avec le marqueur proline ne soit pas possible soit parceque le site génétique n'est pas dans cette région, soit parcequ'il n'a pas de région homologue dans LT2 et qu'il ne peut pas être intégré.

DISCUSSION

D'après les résultats obtenus précédemment (Smith et Levine, 1964, 1965; Cohen et Levine, 1966) et ceux présentés ici, on peut résumer les événements généraux menant soit à la lysogénisation soit à l'infection abortive suivant les complexes infectés étudiés (LT2 ou 1559 infectés par P22 ou L).

a) Lysogénisation

1- Juste après l'infection des bactéries par les phages, les taux de synthèse totaux du DNA, du RNA et des protéines sont inhibés partiellement comme le montre l'incorporation globale des précurseurs radioactifs.

2- Entre la 2^e et la 4^e minute après l'infection, la synthèse du DNA phagique commence.

3- Entre la 6^e et la 8^e minute, la synthèse du DNA du phage est réprimée par le produit du gène C_1^+ et les synthèses globales du RNA et des protéines sont libérées de l'inhibition partielle consécutive à l'infection du phage.

4- Entre la 10^e et 18^e minute, la synthèse des protéines rejoint une courbe parallèle à celle du contrôle non infecté.

5- Entre la 15^e et 20^e minute le taux de synthèse du RNA rejoint une courbe parallèle au contrôle.

6- Entre la 15^e et 45^e minute, la répression de la synthèse du DNA bactérien est levée, et le taux de synthèse du DNA augmente jusqu'à ce qu'il rejoigne une valeur proche de celle du contrôle non infecté. Ensuite, ce taux se stabilise et présente une courbe parallèle à celle du contrôle non infecté.

Il est intéressant de noter que la synthèse de protéines est libérée la première de son inhibition partielle, et rejoint un taux stable avant les autres synthèses. Le DNA bactérien est inhibé beaucoup plus longtemps, peut-être pour permettre l'intégration du prophage. On sait que cette intégration a lieu tard dans le cycle lysogène; en effet les cellules infectées produisent par ségrégation des cellules sans phages - dans un rapport 1:1. Ceci est caractéristique du système P22 comme l'ont décrit Smith et Levine (1966).

b) Infection abortive

Lorsque la souche 1559 est infectée par P22, elle présente des altérations considérables dans les différentes synthèses. On observe alors les faits suivants:

a) le taux de synthèse des protéines diminue fortement à partir d'une à deux minutes après l'infection et l'inhibition n'est pas relâchée à la 8^e minute. Chronologiquement la synthèse des protéines est la première affectée dans l'infection abortive.

b) la synthèse du RNA est inhibée, mais plus tard que celle du DNA et après une levée partielle de la première inhibition due à l'infection.

c) la synthèse du DNA est réprimée à la 12^e minute après l'infection. La répression contrôlée par le gène C_1 a eu le temps de s'exprimer. La répression du DNA due aux produits P_H est indépendante de celle provoquée par les produits des gènes actifs C_1 ou C_2 .

Lorsque le phage recombinant de P22 porte les deux allèles L_H il n'est plus restreint sur la souche 1559 et le taux de synthèse des protéines et par conséquent du DNA et du RNA est comparable à celui du phage L.

Si un recombinant de P22 ne porte que l'allèle L_{H1} , il se comporte de manière semblable à P22 sur 1559. Le fait que l'inhibition du DNA soit partiellement levée pourrait permettre de penser que le marqueur H1 agit au niveau du DNA alors que le marqueur H2 agirait en tout cas au niveau des protéines.

D'autre part, cette classe de recombinants $P22^{L}H1^{P}H2$ présente une efficacité d'étalement d'environ 1 sur la souche 1559 (L) et ses taux de synthèse des protéines et du DNA sont différents de ceux du $P22^{w.t.}$. Ceci signifie soit que la complémentation de $H2^{P}$ par les produits du prophage L est bien plus efficace lorsque le produit $H1^{P}$ manque soit que la complémentation de $H2^{P}$ est meilleure que celle de $H1^{P}$. Seul un recombinant $P22^{P}H1^{L}H2$ aurait pu éclaircir cette situation et permettre de prouver la théorie de l'action de $H1$ au niveau du DNA et $H2$ au niveau des protéines. Jusqu'à maintenant un pareil recombinant a été introuvable.

On peut déduire d'autres propriétés des produits H.

Les deux allèles $H1^{P}$ et $H2^{P}$ semblent récessifs puisqu'il y a complémentation par L. Ce fait et les expériences en présence de CAP permettent de penser que: 1°) les produits H rétablissent la synthèse des protéines affectée par une autre fonction plus précoce, et 2°) ou les gènes H^{P} sont inactifs dans 1559 ou ils ont des produits qui peuvent fonctionner dans LT2 et pas dans 1559. Trois minutes après l'infection, les phages $P22$ et L synthétiseraient un produit inhibiteur de la synthèse des protéines. Quelque temps avant la 6^e minute, les produits H seraient faits et leur rôle consisterait à rétablir la synthèse totale des protéines des cellules infectées. Ces produits H devraient être synthétisés jusqu'à la fin de l'intégration du prophage ou la fin du cycle végétatif. La souche 1559 agirait elle-même directement sur les gènes H de $P22$ ou sur leur produits.

Une autre remarque intéressante consiste dans le fait que lorsque 1559 est lysogène pour $P22$, on perd le caractère d'exclusion du phage surinfectant, et l'efficacité d'étalement de L sur cette souche est presque normale (0,75) (voir Tableau 3). La souche 1559 agit donc aussi sur $P22$ et le caractère sie^{+} ne peut pas s'exprimer normalement dans ces conditions.

Par contre on sait que les substances immunitaires sont fabriquées lors de l'infection abortive jusqu'à la 30^e minute après l'infection (Soska, communication personnelle).

Il n'est pas exclu de penser que la souche 1559 produirait un inactivateur des gènes ou des produits H de P22, gènes qui, à leur tour, participeraient dans le système d'immunité de P22. Le système d'immunité de P22 s'est révélé beaucoup plus compliqué que celui de λ . Bezdek et Amati (1968) ont démontré que les phages P22 et L produisent des recombinaisons toujours tempérés, mais avec des propriétés immunitaires altérées. Au contraire, des croisements entre les phages λ et i434 n'ont pas permis de trouver de tels recombinants et leur système immunitaire est en relation simple avec leur cistron C₁. Les phages P22 et L diffèrent donc des phages lambdoïdes en tout cas par leur système immunitaire qui est contrôlé pour le moins par deux facteurs: i et C₂ dont la localisation génétique est éloignée (Zinder, 1958). Les marqueurs i d'immunité de P22 et L placés tout près de m₃ présentent une certaine ressemblance entre eux (les produits ^Pi étant actifs sur ^Li) de même que les systèmes C des deux phages sont de structure et fonction analogues (Bezdek, Soska et Amati, 1969).

D'après les résultats présentés ici, les produits H semblent indépendants des produits C. Il n'est cependant pas exclu qu'il existe une certaine corrélation entre les fonctions H et C; une étude minutieuse de la région C et H des phages P22 et L permettra sans doute d'éclaircir ces interactions et de mieux définir les analogies et différences entre L et P22 (Bezdek, en préparation).

RESUME ET CONCLUSIONS

Dans la souche de *Salmonella typhimurium* 1559, le phage P22 produit une infection abortive alors que le phage L croit normalement. Les caractères génétiques H, interchangeables entre P22 et L contrôlent le différent comportement des deux phages.

L'étude comparative de l'infection normale ou abortive de 1559 infectée par L ou P22 a permis de définir les fonctions H, puisque les gènes H fonctionnels sont indispensables à la croissance des phages ou à leur lysogénisation. Dans l'infection abortive, la synthèse des protéines est réprimée activement par le phage infectant et n'est pas restaurée comme dans l'infection normale. Les fonctions H permettent cette restauration de la synthèse globale des protéines réprimée tout de suite après l'infection. Elles agissent en levant l'inhibition spécifique des protéines, soit au niveau de l'inhibition, soit sur l'opéron qui le contrôle. Les expériences avec le chloramphénicol ont prouvé que l'inhibiteur des protéines est lui-même de nature protéique et dépend du phage.

Dans l'infection abortive, les produits ^PH manquent ou sont inactivés; ils sont recessifs et non compétitifs avec les produits ^LH en infection mixte. Des fonctions H déficientes ne sont pas directement létales et les cellules meurent par suite de l'inhibition de la synthèse des protéines. Les expériences in vitro ont démontré que le système de synthèse des protéines de 1559 infecté par P22 est intact, donc l'inhibition des protéines caractéristique de l'infection abortive a lieu soit au niveau de la transcription du DNA, soit au niveau des structures bactériennes telles que membranes ou parois cellulaires. La souche 1559 agit elle-même sur la restriction de P22, soit directement sur les gènes H, soit sur leurs produits (ou sur le lieu d'action de ces produits).

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M.H. (1959). Bacteriophages. Wiley (Interscience) New York.
- Amati, P. (1968). Effect of chloramphenicol on DNA synthesis during phage development in E. coli. (Sous presse)
- Bezdek, M., et Amati, P. (1967). Properties of P22 and a related Salmonella typhimurium phage. I. General features and host specificity. Virology 31, 272-278.
- Bezdek, M., et Amati, P. (1968). Evidence for two immunity regulator systems in temperate bacteriophages P22 and L. Virology 36, 701-703.
- Bezdek, M., Soska, J., et Amati, P. (1969). Properties of P22 and a related Salmonella typhimurium phage. III. Studies on clear plaque mutants of phage L. (Sous presse Virology).
- Boyd, J.S.K., et Bidwell, D.E. (1957). The type A phages of Salmonella typhimurium: identification by standardized cross-immunity test. J. Genet. Microbiol. 16, 217-227.
- Cohen, L.W., et Levine, M. (1966). Detection of proteins synthesized during the establishment of lysogeny with phage P22. Virology 28, 208-213.
- Favre, R., Amati, P., et Bezdek, M. (1968). Properties of P22 and a related Salmonella typhimurium phage. II. Effect of H markers on infection of strain 1559. Virology 35, 238-247.
- Konisky, J., et Nomura, M. (1967). Interaction of colicins with bacterial cells. II. Specific alteration of Escherichia coli ribosomes induced by colicins E3 in vivo. J. Mol. Biol. 26, 181-195.
- Levine, M. (1957). Mutations in the temperate phage P22 and lysogeny in Salmonella. Virology 3, 22-41.
- Levine, M., et Curtiss, R. (1961). Genetic fine structure of the C region and the linkage map of phage P22. Genetics 46, 1573-1580.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Luria, S.E. (1964). On the mechanisms of action of colicins. Ann. Inst. Pasteur 107, 67-73.

